



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/63, 15/79, 15/11, 15/10, A61K 48/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/34665 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. December 1995 (21.12.95)
---	-----------	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00775
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Juni 1995 (11.06.95)
(30) Prioritätsdaten:
P 44 21 079.5 16. Juni 1994 (16.06.94) DE
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SEIBEL, Peter [DE/DE]; Obere Hainbachstrasse 2, D-35216 Biedenkopf-Wallau (DE).
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEIBEL, Andrea [DE/DE]; Lärchenstrasse 10, D-97320 Albertshofen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).

Veröffentlicht

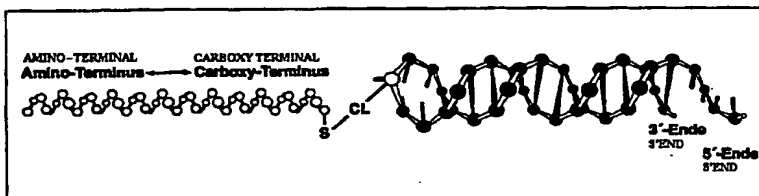
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: CHIMERICAL PEPTIDE-NUCLEIC ACID FRAGMENT, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND ITS USE FOR APPROPRIATELY INTRODUCING NUCLEIC ACIDS INTO CELL ORGANELLES AND CELLS

(54) Bezeichnung: CHIMÄRES PEPTID-NUKLEINSÄURE-FRAGMENT, VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG, SOWIE SEINE VERWENDUNG ZUR ZIELGERICHTETEN NUKLEINSÄUREEINBRINGUNG IN ZELLORGANELLEN UND ZELLEN

(57) Abstract

In order to appropriately introduce genetic material into cell organelles, the corresponding nucleic acid is bound to a cell-specific, compartment-specific or membrane-specific peptide. The nucleic acid is directed by the peptide to the aimed compartment through the natural protein transport paths and is transported through the membrane (the membrane system). For nucleic acids to unfold their replication and transcription activity in cells and cell organelles and to be projected into the cell through the protein import route, they must on the one hand have all required genetic elements and on the other hand must not exceed the pore import capacity. These two requirements caused the development of a linear-cyclic plasmid system which contains all required genetic elements, may be absorbed through the protein import route thanks to its pseudo-linear structure (cyclic DNA ends) and may finally build cyclic replication intermediates. By combining in any desired manner nucleic acids and compartment-specific protein sequences, this process allows nucleic acids to be appropriately introduced into cells and cell organelles. This system is thus suitable both for mutagenesis and in the molecular therapy of genetic diseases.



(57) Zusammenfassung

Um Erbgut zielgerichtet in Zellorganellen einzuführen, wird die entsprechende Nukleinsäure an ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Peptid gebunden. Unter Ausnutzung der natürlichen Proteintransportwege wird die Nukleinsäure von dem Peptid zum Zielkompartiment dirigiert und durch die Membran (das Membransystem) transportiert. Damit die Nukleinsäure eine Replikations- und Transkriptionsaktivität in Zellen und Zellorganellen entfalten und über die Protein-Importroute eingeschleust werden kann, muß sie zum einen über alle notwendigen genetischen Elemente verfügen und zum anderen die Größenskapazität der Importpore nicht übersteigen. Die Kombination dieser Voraussetzungen führte zur Entwicklung eines linear-zyklischen Plasmidsystems, das zum einen alle notwendigen genetischen Elemente beherbergt und zum anderen durch seine pseudo-lineare Struktur (zyklisierte DNA-Enden) über die Protein-Importroute aufgenommen werden kann und anschließend zyklische Replikationsintermediate zu bilden vermag. Das Verfahren ermöglicht durch beliebige Kombination von Nukleinsäuren und kompartimentspezifischen Proteinsequenzen die zielgerichtete Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen und Zellorganellen und damit die Verwendung dieses Systems sowohl in der zielgerichteten Mutagenese als auch zur molekularen Therapie genetischer Erkrankungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, Verfahren zu seiner Herstellung, sowie seine Verwendung zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen

Diese Erfindung betrifft ein chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, das Verfahren zu
5 seiner Herstellung, sowie seine Verwendung zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für Nukleinsäuren sind. Durch physikalische Prozesse (Transformation) und biologische
10 Vorgänge (Infektion) können Zellmembranen aber sehr effizient überwunden werden. Der Transformation, also dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser 'kompetenten Zellen' stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (M. Mandel *et al.* (1970), "Calcium-dependent
15 bacteriophage DNA infection", J. Mol. Biol. 53: 159-162), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals auch von Cohen *et al.* (S.N. Cohen *et al.* (1972), "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", Proc. Natl. Acad.
20 Sci. U. S. A. 69: 2110-2114) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden (M. Dagert *et al.* (1979), "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells", Gene 6: 23-28). Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik
25 läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryotische Zellen, sondern auch in eukaryotische Zellsysteme einzuschleusen (K. Shigekawa *et al.* (1988), "Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells", Biotechniques 6: 742-751). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryotische Zellen wurden von Capecchi (M.R. Capecchi, (1980), "High efficiency

- transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells", *Cell* 22: 479-488) und Klein et al. (T.M. Klein *et al.* (1987), "High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature* 327: 70-73) entwickelt: sie beruhen einmal auf der direkten Injektion der DNA in die einzelne Zelle (Mikroinjektion), sowie
- 5 auf der Beschießung einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffenden Nukleinsäure gebunden wurde ('Shotgun'). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich die biologischen Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die hocheffiziente virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (K.L. Berkner, (1988), "Development of adenovirus vectors for
- 10 the expression of heterologous genes", *Biotechniques* 6: 616-629; L.K. Miller, (1989), "Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors", *Bioessays* 11: 91-95; B. Moss *et al.* (1990), "Product review. New mammalian expression vectors", *Nature* 348: 91-92) und die über Liposomen vermittelte Lipofektion (R.J. Mannino *et al.* (1988), "Liposome mediated gene transfer", *Biotechniques* 6: 682-690; P.L. Felgner *et al.* (1987),
- 15 "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 7413-7417). Alle bisher beschriebenen Methoden behandeln das Überwinden der prokaryotischen oder eukaryotischen Plasmamembran durch nackte oder verpackte Nukleinsäuren. Während mit dem Einschleusen der Nukleinsäure in die prokaryotische Zelle der Wirkort bereits erreicht ist, finden in der kompartimentierten
- 20 eukaryotischen Zelle weitere biochemische Prozesse statt, die unter bestimmten Bedingungen das Eindringen der Nukleinsäure in den Zellkern unterstützen (z. B. viraler Infektionsweg bei HIV). Analoge Infektionsprozesse, bei denen exogene Nukleinsäuren aktiv in andere Zellorganellen eingeschleust werden (z. B. in Mitochondrien), wurden bisher nicht beschrieben.
- 25 Neben der Einbringung der Nukleinsäure in die Zelle bzw. die Zellorganelle spielt die Transkription und vor allem die Replikation der eingeführten Nukleinsäure eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß DNA-Moleküle über eine besondere Eigenschaft verfügen können, die unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle eine Verdoppelung zuläßt. Hierzu trägt ein besonderes Strukturelement, der
-

Ursprungspunkt der DNA-Replikation bei (ori, origin), dessen Anwesenheit die Fähigkeit zur DNA-Replikation verleiht (K.J. Marians (1992), "Prokaryotic DNA replication", Annu. Rev. Biochem. 61: 673-719; M.L. DePamphilis (1993), "Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin", Annu. Rev. Biochem. 62: 29-63; H. Echols und M.F. Goodman (1991), "Fidelity mechanisms in DNA replication", Annu. Rev. Biochem. 60: 477-511).

Der streng kontrollierte Prozeß der DNA-Replikation beginnt in *E. coli* beispielsweise mit der Bindung eines Proteins (K. Geider und H. Hoffmann Berling (1981), "Proteins controlling the helical structure of DNA", Annu. Rev. Biochem. 50: 233-260) an die hochspezifische Initiationsstelle und definiert damit den Startpunkt für eine spezifische

10 RNA-Polymerase (Primase). Sie synthetisiert einen kurzen RNA-Strang (~10 Nukleotide, 'Primer'), der zu einem der DNA-Matrizenstränge komplementär ist. Die 3'-Hydroxylgruppe des terminalen Ribonukleotids dieser RNA-Kette dient als 'Primer' für die Synthese neuer DNA durch eine DNA-Polymerase. DNA-entwindende Proteine entspiralisieren die DNA-Doppelhelix (J.C. Wang (1985), "DNA topoisomerases", Annu.

15 Rev. Biochem. 54: 665-697). Die separierten Einzelstränge werden durch DNA-bindende Proteine in ihrer Konformation stabilisiert (J.W. Chase und K.R. Williams (1986), "Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication", Annu. Rev. Biochem. 55: 103-136), um eine störungsfreie Funktion der DNA-Polymerasen zu ermöglichen (T.S. Wang (1991), "Eukaryotic DNA polymerases", Annu. Rev. Biochem.

20 60: 513-552). Ein Multienzymkomplex, das Holoenzym der DNA-Polymerase-III, synthetisiert den größten Teil der neuen DNA. Der RNA-Teil des chimären RNA-DNA-Moleküls wird anschließend von der DNA-Polymerase III abgespalten. Die Entfernung der RNA von den neu entstandenen DNA-Ketten läßt Lücken zwischen den DNA-Fragmenten entstehen. Diese Lücken werden von der DNA-Polymerase I ausgefüllt,

25 die DNA aus einer Einstrang-Matrize neu aufbauen kann. Während bei der Replikation einer der beiden neu synthetisierten DNA-Stränge kontinuierlich aufgebaut wird (5'-3'-Richtung, Leitstrang), beobachtete Ogawa und Okazaki, daß ein Großteil des neusynthetisierten Gegenstranges (3'-5'-Richtung, Verzögerungsstrang) aus kurzen DNA Fragmenten aufgebaut wurde (T. Ogawa und T. Okazaki (1980), "Discontinuous DNA

30 replication", Annu. Rev. Biochem. 49: 421-457). Sogenannte Primasen initiieren hier

- durch die Synthese mehrerer RNA-Primer den Beginn der DNA-Synthese des Gegenstranges. Mit fortschreitender Replikation werden diese Fragmente von ihren RNA-Primern befreit, die Lücken geschlossen und von der DNA-Ligase kovalent zu langen Tochtersträngen miteinander verknüpft. Nach der Beendigung des
- 5 Replikationszyklusses entstehen zwei Chromosome.

- Im Unterschied dazu wird die DNA-Replikation von vielen Plasmiden über einen Replikationsursprung gesteuert, der auf die Synthese des Verzögerungsstranges (3'-5'-Richtung) verzichtet und die Synthese von zwei kontinuierlichen DNA-Strängen bidirektional initiieren kann (jeweils in 5'-3'-Richtung entlang der beiden Matrizen). Die
- 10 Voraussetzung für eine vollständige DNA-Replikation ist hier die zyklische Form der Nukleinsäure. Sie gewährleistet, daß die DNA-Polymerasen am Ende der Neusynthese der komplementären DNA-Stränge wieder an den Ausgangspunkt zurückgelangen, wo nun Ligasen die kovalente Verknüpfung der Enden der beiden neusynthetisierten Tochterstränge gewährleisten.
- 15 Eine interessante Form linear-zyklischer Nukleinsäuren ist aus Pockenviren bekannt: durch sogenannte 'hairpin-loops' an den Enden ihrer linearen Genome verfügen sie unter Beibehaltung einer überwiegend linearen Konformation über eine zyklische Molekülstruktur (D.N. Black et al. (1986), "Genomic relationship between capripoxviruses", Virus Res. 5: 277-292; J.J. Esposito und J.C. Knight (1985),
- 20 "Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps", Virology 143: 230-251). Kovalent geschlossene 'hairpin'-Nukleinsäuren wurden nicht nur in Pockenviren gefunden, sondern auch für die ribosomale RNA aus Tetrahymena (E.H. Blackburn und J.G. Gall (1978), "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena", J. Mol. Biol. 120: 33-53), und den Genomen der
- 25 Parvoviren (S.E. Straus et al. (1976), "Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73: 742-746; P. Tattersall und D.C. Ward (1976), "Rolling hairpin model for

replication of parvovirus and linear chromosomal DNA", Nature 263: 106-109) beschrieben.

Mit den bisher bekannten Plasmiden oder Nukleinsäurekonstrukten ist es aber nicht möglich, Nukleinsäuren zielgerichtet über die Protein-Importroute in Zellen oder
5 Zellorganellen einzubringen. Dies ist aber zum Beispiel Voraussetzung dafür, Veränderungen des mitochondrialen Genoms von Patienten mit neuromuskulären und neurodegenerativen Erkrankungen auf genetischer Ebene behandeln, oder eine zielgerichtete Mutagenese in Mitochondrien oder anderen Zellorganellen durchführen zu können.

10 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein Konstrukt auf Nukleinsäure-Basis zu entwickeln, das das gerichtete Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen und Kompartimente eukaryotischer Zellen erlaubt. Außerdem soll ein Verfahren bereitgestellt werden, wie dieses Konstrukt in Zellkompartimente oder Zellen gelangen kann. Weiterhin sollte die eingeführte Nukleinsäure so beschaffen sein, daß sie auch als
15 replikationsfähige Nukleinsäure über zelluläre Protein-Importwege aufgenommen werden kann. Außerdem sollten Eigenschaften vorhanden sein, die zu einer gesteuerten Transkription und/oder Replikation in Zellen bzw. in definierten Zielkompartimenten einer Zelle führen. Das Verfahren soll zur Therapie von genetischen Erkrankungen (Veränderungen am mitochondrialen Genom) und zur zielgerichteten Mutagenese in
20 eukaryotischen und prokaryotischen Zellen eingesetzt werden. Die Erfindung soll folgende Anforderungen:

- universelle Anwendbarkeit
 - zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
 - hohe Effektivität
 - 25 - geringe Immunogenität
 - Minimierung des Infektionsrisikos
 - die eingeführte Nukleinsäure (Plasmidmolekül) soll replizierbar sein
-

- die eingeführte Nukleinsäure (Plasmidmolekül) soll transkribierbar sein
- die eingeführte Nukleinsäure (Plasmidmolekül) soll gegen Nukleasen stabil sein
- die Struktur der eingeführten Nukleinsäure (Plasmidmolekül) sollte universell verwendbar sein

5 Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1), 25), 54), 56), 58), 60) und 61). Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Um ein Protein innerhalb einer Zelle vom Entstehungsort gezielt zu einem anderen Kompartiment oder einer anderen Zellorganelle (z. B. den Wirkort) befördern zu können, wird das Protein in der Regel als Präprotein synthetisiert (R. Zimmermann *et al.* (1983),

- 10 "Biosynthesis and assembly of nuclear-coded mitochondrial membrane proteins in *Neurospora crassa*", *Methods Enzymol.* 97: 275-286). Neben der maturierten Aminosäuresequenz verfügt das Präprotein über eine sogenannte Signalsequenz. Diese Signalsequenz ist spezifisch für das Zielkompartiment und sorgt dafür, daß das Präprotein durch Oberflächenrezeptoren erkannt werden kann. Das natürliche Hindernis 'Membran'
- 15 wird dann überwunden, indem das Präprotein durch einen aktiven (mehrere 'Transport-Proteine' sind an diesem Prozeß beteiligt) oder passiven Prozeß (direkter Durchtritt ohne Beteiligung weiterer Proteine) durch die Membran transloziert wird. Am Wirkort wird dann die Signalsequenz in der Regel durch eine spezifische Peptidase abgetrennt, sofern sie nicht selbst Bestandteil des maturierten Proteins ist. Das maturierte
- 20 Protein kann nun seine enzymatische Aktivität entfalten.

- Es wurde von den Erfindern erkannt, daß dieser Mechanismus ausgenutzt werden kann, um Nukleinsäuren zielgerichtet durch Membranen zu schleusen. Dabei unterliegt die Nukleinsäure keiner Beschränkung, das heißt es kann jede gewünschte bzw. bekannte Nukleinsäure verwendet werden. Dazu wird eine zell-, kompartiment- oder
- 25 membranspezifische Signalsequenz an die gewünschte Nukleinsäure gekoppelt, wobei ein chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment entsteht. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß die Kopplung zwischen einer Nukleinsäure und einem Peptid über die mit

ϵ -Maleimidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimdesther modifizierte α -Aminogruppe eines synthetischen KDEL-Peptides erfolgen kann (K. Arar *et al.*, (1993), "Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates containing a KDEL signal sequence", Tetrahedron Lett. 34: 8087-8090). Diese Verknüpfungsstrategie ist für die Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen jedoch völlig unbrauchbar, da hierbei Translokation analog zum natürlichen Proteintransport erfolgen soll. Mit der Blockierung der α -Aminogruppe eines synthetischen Peptides durch eine Nukleinsäure ist ein derartiger Transport nicht zu erwarten. Von den Erfindern wurde deshalb eine Kopplung über eine Carboxy-terminale Aminosäure gewählt. Das gewährleistet zum einen eine 'lineare' Verknüpfung, zum anderen steht das freie Amino-terminale Ende des Signalpeptids damit für die essentiellen Schritte der Importreaktion zur Verfügung.

Um den beschriebenen Transportmechanismus auch für die Einbringung von replikativen und transkriptionsaktiven Nukleinsäuren nutzbar machen zu können, wird die Nukleinsäure vorzugsweise über eine homologe Rekombination in ein vorhandenes Genom integriert, oder ist selbst Träger der genetischen Elemente, die eine autonome Initiation von Replikation und Transkription gewährleistet. Nur die letzte Variante erfüllt das Kriterium der universellen Anwendbarkeit, da eine Rekombination in ein vorhandenes zelluläres Genom nur unter bestimmten Bedingungen und in ausgewählten Zellen gelingt.

Eine Möglichkeit bietet hier die Verwendung zyklischer DNA, da die DNA-Polymerasen am Ende der Neusynthese der Tochterstränge wieder an den Ausgangspunkt zurückgelangen und damit eine vollständige DNA-Replikation gewährleisten. Während die Verwendung eines doppelsträngigen zyklischen Plasmides alle physikalischen Kriterien für eine erfolgreiche Replikation in jedem Zielkompartiment der Zelle erfüllt, steht dieser physikalischen DNA-Form jedoch die Größenkapazität der Importpore gegenüber, die entscheidend an der zielgerichteten Translokation beteiligt ist: bereits der kompakte Durchmesser eines superhelikalen Plasmides ist dem globulärer Proteine vergleichbar und läßt eine Translokation durch ein Membransystem über die Protein-Importroute aussichtslos erscheinen. Der Lösungsansatz besteht hier in der Verwendung

linear-zyklischer DNA-Moleküle, die über modifizierte (zyklisierte) Enden verfügen, trotzdem aber nur den Durchmesser linearer DNA-Moleküle aufweisen. Diese stellen zum einen kein Hindernis für die Größe der Importpore dar, zum anderen verfügen diese linear-zyklischen DNA-Moleküle über alle physikalischen Voraussetzungen, um in den
5 Mitochondrien replikative und transkriptionsaktive Plasmide bilden zu können.

Für die Konstruktion des erfindungsgemäßen chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes, sowie für die Konstruktion eines replikativen und transkriptionsaktiven Nukleinsäureanteils (Plasmid) benötigt man vorzugsweise:

- Signalpeptid bzw. Signalsequenz (zell-, kompartment- oder membranspezifisch)
- 10 - Kopplungsagenz
- Nukleinsäure (Oligonukleotid), die vorzugsweise die folgenden weiteren Informationen umfassen kann:
 - Informationen zur Initiation und Regulation von Transkription und Replikation
 - Informationen für die Termination der Transkription und Replikation
 - 15 - multiple Klonierungsstelle für eine zusätzlich einzufügende (zu expremierende) Nukleinsäure
 - Modifikationsmöglichkeiten, so daß 'hairpin-loops' angefügt werden können (Zyklisierung der Enden), die eine Verknüpfung zum Signalpeptid zulassen

Die Auswahl der Signalsequenz hängt davon ab, welche Membran bzw. welches
20 Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Zellkern, Mitochondrion, Chloroplast) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Proteine, die zum Beispiel in eines der vier mitochondrialen Kompartimente (äußere Mitochondrienmembran, Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran, Matrixraum) eingeführt werden sollen, besitzen kompartimentspezifische Signalsequenzen. Für die
25 Einbringung von Nukleinsäuren werden im allgemeinen Signalsequenzen ausgewählt, die ein zell-, kompartment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und

dadurch die angehängte Nukleinsäure an ihren Wirkungsort dirigieren (z.B. innere Seite der inneren Mitochondrienmembran oder Matrixraum). Zur Auswahl stehen Signalsequenzen, die Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Für die Nukleinsäureeinbringung werden Signalsequenzen

5 bevorzugt, die unabhängig von Membranpotentialen arbeiten, z.B. die Signalsequenz der Ornithintranscarbamylase (OTC) für den Transport in den Matrixraum der Mitochondrien (A.L. Horwich *et al.* (1983), "Molecular cloning of the cDNA coding for rat ornithine transcarbamoylase", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 4258-4262; J.P. Kraus *et al.* (1985), "A cDNA clone for the precursor of rat mitochondrial ornithine transcarbamylase:

10 comparison of rat and human leader sequences and conservation of catalytic sites", Nucleic. Acids. Res. 13: 943-952). Grundsätzlich ist für den Transport in das Zielkompartiment die reine Signalsequenz ausreichend. Bevorzugt werden aber Signalsequenzen ausgewählt, die zusätzlich über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese 'Spaltstelle' liegt im günstigsten Fall innerhalb der

15 Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach dem Erreichen des Zielkompartimentes das Abspalten der Signalsequenz sicherzustellen (z.B. kann die Signalsequenz der menschlichen OTC um weitere zehn Aminosäuren der maturierten OTC verlängert werden). Damit wird gewährleistet, daß die Nukleinsäure im Zielkompartiment von dem Signalpeptid abgetrennt werden kann und

20 sich damit die Wirkung der Nukleinsäure voll entfaltet. Hergestellt wird die ausgewählte Signalsequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Signalsequenzen oder Klonierung und Expression der Signalsequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf chemisch-synthetischem Weg.

Um eine lineare chemische Verknüpfung zwischen Nukleinsäure und Signalpeptid zu

25 gewährleisten, erfolgt die Kopplung des Signalpeptids über ein Kopplungsagenz, das im allgemeinen über Aminosäuren, bevorzugt über Aminosäuren mit reaktiven Seitengruppen, bevorzugt über ein einzelnes Cystein oder Lysin am Carboxy-terminalen Ende des Signalpeptides mit diesem verbunden ist. Als Kopplungsreagenz dient ein bifunktionaler Crosslinker, bevorzugt ein heterobifunktionaler Crosslinker, der bei Verwendung eines

Cysteins als Kopplungsstelle am Signalpeptid neben einer thiolreaktiven Gruppe über eine zweite reaktive Gruppe, bevorzugt eine aminoreaktive Gruppierung verfügt (z. B. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, MBS und seine Derivate).

Auch die Nukleinsäure verfügt über eine Kopplungsstelle, die kompatibel zum
5 ausgewählten Crosslinker sein sollte. Bei der Verwendung von MBS sollte das Oligonukleotid über eine Amino- oder Thiofunktion verfügen. Die Kopplungsgruppe der Nukleinsäure kann über die chemische Synthese des Oligonukleotids eingeführt werden und ist im allgemeinen am 5'-Ende, am 3'-Ende, bevorzugt aber direkt an einer modifizierten Base lokalisiert, z. B. als 5'-Aminolinker (TFA-Aminolinker Amidite^R,
10 1,6-(N-Trifluoroacetyl-amino)-hexyl-β-Cyanoethyl-N,N-Diisopropyl Phosphoramidite, Pharmacia) oder als 5'-Thiolinker (THIOL-C6 Phosphoramidit^R, MWG Biotech) an einer freien 5'-Hydroxy/Phosphatgruppe, als 3'-Aminolinker (3'-Aminomodifizier-C7-CPG-Synthesäulen^R, MWG Biotech) an einer freien 3'-Hydroxy/Phosphatgruppe, bevorzugt aber als aminomodifiziertes Basenalogon, bevorzugt aminomodifiziertes Deoxyuridin
15 (Amino-Modifizier-dT^R, 5'-Dimethoxy-trityl-5-[N-(trifluoroacetylaminohexyl)-3-acrylimido]-2'-desoxy uridin, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen Research) innerhalb der Sequenz. Die zum verwendeten Crosslinker kompatible reaktive Gruppe ist dabei mindestens durch eine C2-Spacer Einheit, bevorzugt aber durch eine C6-Spacer Einheit vom 5'- oder 3'-Ende des Oligonukleotids oder der modifizierten Base
20 distanziert. Die Nukleinsäure (Oligonukleotid) mit reaktiver Kopplungsgruppe umfaßt dabei mindestens zwei Nukleotide.

Um die Stabilität der Nukleinsäure (Oligonukleotid) gegenüber zellulären und extrazellulären Nukleasen zu erhöhen, können die chemisch synthetisierten Nukleinsäuren durch ein sulfurizierendes Reagenz (Beaucage-Reagenz^R, MWG-Biotech) geschützt
25 werden. Bei der chemischen Synthese werden dabei die Phosphordiester-Bindungen der Nukleinsäure in Phosphorthioat-Bindungen umgewandelt. Dieses Oligonukleotid läßt sich dann für die enzymatische Amplifizierung von Nukleinsäuren einsetzen, durch weitere Verknüpfungsreaktionen mit anderen Nukleinsäuren verlängern oder direkt verwenden.

Um das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment direkt einzusetzen, sollte die Nukleinsäure (Oligonukleotid) über eine hybridisierungsfähige Sekundärstruktur verfügen, bevorzugt ohne interne Homologien, um eine lineare Einzelstrangstruktur ausbilden zu können. Damit wird sichergestellt, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) des chimären

5 Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes ohne weitere Nukleinsäureankopplungen eine biochemische/therapeutische Wirkung entfalten kann.

Zur Kopplung mit der Signalsequenz werden aber bevorzugt Nukleinsäuren (Oligonukleotide) eingesetzt, die über zwei weitere Eigenschaften verfügen:

1. Die Sequenz ist bevorzugt partiell palindromisch, mit einem glatten 5'-3'-Ende ('blunt end'), überhängendem 3'- Ende ('sticky end'), bevorzugt aber mit überhängendem, phosphorylierten 5'-Ende ('sticky end'), ganz bevorzugt mit einem 4 Nukleotide umfassenden überhängenden 5'-Ende, das keine Selbsthomologie (palindromische Sequenz) aufweist. Dadurch kann sich eine stabile, monomere Sekundärstruktur ('hairpin-loop') ausbilden. Das überhängende 5'-Ende dient dazu, definierte
- 15 Nukleinsäuren, Antisense-Oligonukleotide, bevorzugt aber transkribierbare und replizierbare Gene anzukoppeln.
2. Das Oligonukleotid trägt im Scheitelpunkt des 'loops' eine modifizierte Base, die eine zum Crosslinker reaktive Gruppierung trägt, bevorzugt ein aminomodifiziertes 2'-Deoxythymidin. Die Aminofunktion dieser modifizierten Base ermöglicht dabei die
- 20 Kopplungsreaktion zwischen MBS und Oligonukleotid.

Das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment eignet sich zum gezielten Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen und Zellorganellen (z. B. Zellkern, Chloroplast), insbesondere zum Einbringen von Ribonukleinsäuren (mRNAs, 'Antisense'-Oligonukleotide) und Desoxyribonukleinsäuren (vollständigen Gene, 'Antisense'-Oligonukleotide). Besonders

25 eignet er sich zum Einschleusen von transkribierbaren und prozessierbaren Genen in

Mitochondrien, ganz besonders aber zum Einschleusen von replikativen, transkriptionsaktiven und prozessierbaren linear-zyklischen Nukleinsäuren (Plasmiden).

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird an die Nukleinsäure, enthaltend die reaktive Kopplungsstelle, oder an das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment ein transkribierbares
- 5 Gen angekoppelt werden. Bevorzugt geschieht dies durch die Amplifizierung eines Gens, bevorzugt eines klonierten Gens, das aus einem mitochondrialen Promotor, bevorzugt dem Promotor des leichten DNA Stranges (O_L , nt 490 - nt 369) und dem zu expremierenden Gen in einer prozessierbaren Form, bevorzugt einem mitochondrialen Gen, bevorzugt einer mitochondrialen transfer RNA, bevorzugt der mitochondrialen tRNA^{Leu(UUR)} (nt 3204 - nt
- 10 3345), besteht (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465). Nach der enzymatischen Amplifizierung des Gens kann die Kopplung an die Nukleinsäure, enthaltend die reaktive Kopplungsstelle, oder an das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment über eine 'blunt-end'-Ligation, bevorzugt aber eine 'sticky-end'-Ligation, angekoppelt werden. Dazu verfügt die
- 15 anzukoppelnde Nukleinsäure über mindestens ein kopplungsfähiges Ende, das bevorzugt aus einem 4 Nukleotide umfassenden 5'-Überhang besteht und keine Selbsthomologie (palindromische Sequenz) aufweist. Sollen beide Enden mit 'hairpin-loops' gekoppelt werden, so wird bevorzugt eine Nukleinsäure ausgewählt, die über unterschiedliche 5'-Überhänge verfügt, die bevorzugt 4 Nukleotide umfassen und keine Selbsthomologie
- 20 aufweisen. Ganz bevorzugt werden Nukleinsäuren verwendet, deren 5'-Enden auch zueinander keine Homologie besitzen. Für die Modifikation der Enden (Zyklisierung) werden dann bevorzugt zwei unterschiedliche 'hairpin-loops' verwendet, wobei einer spezifisch (komplementär) für das 'linke'-Plasmidende, der andere spezifisch für das 'rechte'-Plasmidende der Nukleinsäure ist. Um die Stabilität der Nukleinsäure gegenüber
- 25 zellulären und extrazellulären Nukleasen zu erhöhen, können die Phosphordiester-Bindungen der Nukleinsäure durch Phosphorthioat-Bindungen substituiert und damit geschützt werden, wenn bereits bei der enzymatischen Amplifizierung modifizierte Phosphorthioat-Nukleotide verwandt werden.

Zur Herstellung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments eignet sich ein Verfahren, daß die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Umsetzung einer Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, mit einem Kopplungsagenz.
 - 5 (b) Umsetzung des Konstruktes aus (a) mit Aminosäuren am Carboxy-terminalen Ende eines Peptids, enthaltend eine Signalsequenz, ausgenommen eine KDEL-Signalsequenz, und
 - (c) wahlweise Verlängerung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments aus (b) um weitere DNA- oder RNA-Fragmente.
- 10 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment durch folgende Schritte hergestellt werden:
- (a) Wahlweise Verlängerung der Nukleinsäure, enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, um weitere DNA- oder RNA-Fragmente.
 - (b) Umsetzung der Nukleinsäure mit funktioneller Kopplungsgruppe oder der
 - 15 verlängerten Nukleinsäure aus (a) mit einem Kopplungsagenz.
 - (c) Umsetzung des Konstruktes aus (b) mit Aminosäuren am Carboxy-terminalen Ende eines Peptids, verfügen, enthaltend eine Signalsequenz, ausgenommen eine KDEL-Signalsequenz.

In einer anderen Ausführungsform, bei der es sich um eine linear zyklische Nukleinsäure

20 in Form eines Plasmids handelt, hängt die Auswahl der Nukleinsäure davon ab, welche genetische Information man in welcher Zelle und in welchem Zielkompartiment der Zelle exprimieren will. In diesem Zusammenhang müssen Nukleinsäuren, die transkribiert werden sollen, über einen geeigneten Promotor verfügen. Soll ein Gen zum Beispiel in der mitochondrialen Matrix exprimiert werden, so kann ein mitochondrialer Promotor

25 ausgewählt werden, bevorzugt der Promotor des leichten mtDNA-Stranges. Die Steuerung

der Transkription erfolgt in anderen Zellkompartimenten (z.B. Zellkern, Chloroplast) durch kompartimentspezifische Promotoren.

Die Regulation der Transkription erfolgt in der Regel durch sogenannte Transkriptions-Regulationssequenzen, bevorzugt mitochondriale Transkriptions-
5 Regulationssequenzen. Im allgemeinen umfassen diese Sequenzen mindestens Bindungsstellen für Faktoren, die die Transkription initiieren (Transkriptions-initiationsfaktor), sowie die Bindungsstelle für den RNA-Syntheseapparat. Soll eine Transkription in den Mitochondrien eingeleitet werden, eignen sich hier Bindungssequenzen der mitochondrialen Transkriptionsfaktoren und der RNA-
10 Polymerase, besonders des mitochondrialen Transkriptionsfaktors 1 und der mitochondrialen RNA-Polymerase. In anderen Zellkompartimenten (z.B. Zellkern, Chloroplast) kann die Transkription durch kompartimentspezifische Transkriptions-Regulationssequenzen kontrolliert werden.

Um die Transkription regulieren zu können, verfügt das Plasmid über
15 Transkriptions-Regulationssequenzen, die bevorzugt in 3'-Richtung zu der Transkriptions-Initiationsstelle (Promotor) angefügt sind. Soll zum Beispiel die Transkription eines mitochondrialen Transformationsplasmids reguliert werden, so eignen sich die Kontrollelemente für die H- und L-Strang Transkription des mitochondrialen Genoms, bevorzugt aber die sogenannten 'conserved sequence blocks', die die Transkription des
20 L-Stranges terminieren und gleichzeitig den Übergang zur DNA-Replikation ermöglichen.

Um die ausschließliche Transkription des gewünschten Gens (ggfs. der gewünschten Gene bei einer polycistronischen Transkription) zu induzieren, wird die Transkription an einer geeigneten Stelle hinter dem 3'-Ende des expressionsfähigen Gens / der Gene unterbrochen. Das wird durch das Einfügen einer geeigneten Transkriptions-
25 Terminationsstelle, bevorzugt in 3'-Richtung zum Promotor angeordnet, erreicht. Für die regulierte Expression eignet sich hier besonders die Bindungssequenz für einen bidirektional wirkenden Transkriptions-Terminations-Faktor. Für die Transkriptions-Termination in den Mitochondrien wird hier bevorzugt ein Bindungsmotiv eines

mitochondrialen Transkriptions-Terminationsfaktors ausgewählt. Gleichzeitig wird mit der Verwendung einer Transkriptions-Terminationsfaktor-Bindungssequenz die Bildung von 'Antisense-RNA' der Kopf-Kopf verknüpften dimeren Plasmide unterdrückt.

Die Kontrolle der Selektion transformierter Zellen kann über die Expression eines
5 Reportergens erfolgen. Als Reporter- oder Selektionsgen eignen sich insbesondere
expressionsfähige Gene, deren Expression zu einer makroskopischen Änderung des
Phänotypes führen. Zur Auswahl stehen hier zum Beispiel Gene, die
Antibiotikaresistenzen auslösen. Insbesondere die Resistenzgene für Oligomycin (OLI)
oder Chloramphenicol (CAP) sind für die Anwendung in einem mitochondrialen
10 Transformationssystem geeignet. Als besonders geeignetes Selektionsgen erscheint in
diesem Zusammenhang das mitochondriale Chloramphenicolresistenzgen, da
CAP-sensitive Zelllinien ihren Phänotyp bereits bei einem Anteil von ca. 10 % des 16 S
rRNA^{CAP+}-Gens ändern.

Die Replikation der Nukleinsäure läßt sich durch eine Initiationsstelle für die
15 DNA-Replikation (Replikationsursprung) realisieren. Das chimäre
Peptid-Nukleinsäure-Fragment in Form eines Plasmids muß daher über mindestens einen
Replikationsursprung verfügen. Die Orientierung des Replikationsursprunges kann dabei
unabhängig von dem expressionsfähigen Gen (Genen) angeordnet sein, bevorzugt wird der
Replikationsursprung aber in 3'-Richtung zum Promotor angeordnet. Ein geeigneter
20 Replikationsursprung für ein mitochondriales Transformationsplasmid wäre ein
mitochondrialer Replikationsursprung. Im besonderen eignet sich hier der Ursprung der
Replikation des schweren mtDNA-Stranges, der bevorzugt über mindestens einen
'conserved sequence block' verfügt. Die Replikation läßt sich über sogenannte
Regulationssequenzen für die Replikation kontrollieren. Dazu muß das Plasmid über
25 mindestens ein derartiges Sequenzmotiv verfügen, das bevorzugt in 3'-Richtung zum
Promotor und zum Replikationsursprung angeordnet ist. Soll die Replikation in den
Mitochondrien reguliert werden, eignet sich hier besonders eine mitochondriale
Replikations-Regulationssequenz. Bevorzugt wird ein Motiv verwendet, das mindestens

eine der 'termination associated sequences' beinhaltet. In anderen Zellkompartimenten (z.B. Zellkern, Chloroplast) wird die Replikation bevorzugt über mindestens einen kompartimentspezifischen Replikationsursprung initiiert und über kompartimentspezifische Replikations-Regulationssequenzen kontrolliert.

- 5 Um die Klonierung unterschiedlicher Gene in das Plasmidmolekül zu erlauben, muß die Plasmidnukleinsäure auch über ein geeignetes Klonierungsmodul (multiple Klonierungsstelle) verfügen, das über möglichst unterschiedliche Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen verfügt. Besonders geeignet sind hier seltene Erkennungssequenzen, die nicht an anderen Stellen des Plasmids vorkommen. Das
- 10 Klonierungsmodul kann an einer beliebigen Stelle des Transformationsplasmids eingebaut werden. Soll der Bereich der Klonierungsstelle in die Transkription des Selektionsgens integriert werden, eignet sich die Insertion der multiplen Klonierungsstelle in 3'-Richtung zu dem Promotor und in 5'-Richtung zu der Transkriptions-Terminationsstelle. Besonders geeignet ist die Integration der multiplen Klonierungsstelle in 5'-Richtung zu dem
- 15 Selektionsgen, da es dabei bei der Verwendung des Selektionssystems gleichzeitig zu einer Transkription des Bereichs der multiplen Klonierungsstelle kommt.

- Um bei der Verwendung einer Nukleinsäure die autonome Replikation in jedem Zielkompartiment einer Zelle zu erlauben, muß gewährleistet werden, daß die DNA-Replikationsenzyme nach der Synthese des Tochterstranges wieder an den
- 20 Syntheseausgangspunkt zurückgelangen, um die kovalente Verknüpfung des 3'- mit dem 5'-Ende des neu synthetisierten Tochterstranges durch entsprechende Enzyme sicherzustellen. Dazu eignet sich ein lineares Nukleinsäureplasmid, das sich in eine zyklische Nukleinsäure überführen läßt. Eine Zyklisierung der Plasmidenden kann über die Verwendung sogenannter ligationsfähiger (phosphorylierter) Enden der Nukleinsäure
- 25 erfolgen. Besonders geeignet ist hierzu die Verwendung einer 'blunt-end'-Nukleinsäure oder einer Nukleinsäure mit 3'-überhängenden Enden, bevorzugt aber einer Nukleinsäure mit 5'-überhängenden Enden. Die überhängenden Enden sollten dabei jeweils mindestens ein Nukleotid umfassen. Bevorzugt werden aber 5'-überhängende Enden verwendet, die
-

aus vier Nukleotiden gebildet werden. Diese verfügen bevorzugt über keine Selbsthomologie (palindromische Sequenz) und sind auch bevorzugt zueinander nicht komplementär, um bei einer späteren Nukleinsäureverknüpfung die Dimerenbildung zu unterdrücken.

- 5 Die Zyklisierung der vorbereiteten Plasmidenden wird über synthetische Oligonukleotide vermittelt. Diese verfügen über eine partielle Selbsthomologie (partiell palindromische Sequenz) und sind dadurch zur Ausbildung sogenannter 'hairpin-loop'-Strukturen befähigt. Die partiell palindromische Sequenz führt zu der Ausbildung einer stabilen, bevorzugt monomeren, Sekundärstruktur ('hairpin-loop'), mit einem glatten 5'-3'-Ende (blunt-end),
 - 10 einem überhängenden 3'-Ende ('sticky-end'), bevorzugt aber mit einem überhängenden 5'-Ende. Besonders eignen sich diese Oligonukleotide, wenn sie über ein phosphoryliertes 5'-Ende verfügen. Unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden mit 'hairpin-loop'-Struktur kann nun die lineare Plasmid-DNA in ein linear-zyklisches System überführt werden. Die Enden der beiden Oligonukleotide sind bevorzugt jeweils zu einem
 - 15 Ende der vorbereiteten Plasmidnukleinsäure komplementär. Bevorzugt werden hierzu zwei unterschiedliche 'hairpin-loops' eingesetzt, einer spezifisch (komplementär) für das 'linke'-Plasmidende, einer spezifisch (komplementär) für das 'rechte'-Plasmidende, um die Dimerenbildung zu unterdrücken. Mindestens eines der beiden 'hairpin-loop' Oligonukleotide kann über mindestens ein modifiziertes Nukleotid verfügen. Dieses stellt
 - 20 die Kopplungsstelle zu einem Signalpeptid sicher, damit der Nukleinsäuretransport über die Protein-Importroute vermittelt werden kann. Idealerweise sitzt diese Kopplungsstelle (modifiziertes Nukleotid) an einer der ungepaarten Positionen des 'loops'. Als Kopplungsstelle eignet sich eine chemisch reaktive Gruppe, insbesondere eine Amino- oder Thiofunktion.
 - 25 Um die Enden des Transformationsplasmids für die Modifizierung (Zyklisierung) vorzubereiten, muß sichergestellt werden, daß die Enden des Plasmids mit den Enden der Oligonukleotide ('hairpin-loops') komplementär sind. Das gelingt zum einen durch die Amplifizierung der Plasmid-DNA mit geeigneten Oligonukleotiden, die über mindestens
-

- eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease verfügen. Es eignen sich hier Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die nicht wiederholt in der Plasmidsequenz auftreten. Besonders geeignet ist die Verwendung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die überhängende Enden
- 5 ('sticky-ends') generieren, insbesondere derer, die 5'-überhängende Enden, bevorzugt außerhalb der eigenen Erkennungssequenz, erzeugen. In diesem Zusammenhang eignet sich besonders die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bsa* I (GGTCTCN₁N₅). Zum anderen eignet sich hier die Verwendung einer klonierten Nukleinsäure, die bereits über die Erkennungssequenzen für eine
- 10 Restriktionsendonuklease, bevorzugt *Bsa* I, verfügt. Damit kann die enzymatische Amplifizierung entfallen und die über eine Plasmidpräparation/Restriktionsenzymbehandlung gewonnene Nukleinsäure direkt Verwendung finden. Bevorzugt beinhaltet die klonierte Nukleinsäure an beiden Enden bereits die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bsa* I.
- 15 Für die Reinigung des Transformationsplasmids stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Das Ziel ist hier in erster Linie, die zyklisierten Plasmidmoleküle von nicht umgesetzten Edukten abzutrennen. Die Verwendung von DNA-abbauenden Enzymen hat sich in diesem Zusammenhang als geeignet erwiesen, besonders empfiehlt sich hier die Verwendung von Enzymen, die über eine 5'-3'- oder 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügen.
- 20 Insbesondere die Verwendung der Exonuklease III führt zu der vollständigen Hydrolyse nicht umgesetzter Edukte, während die zyklisierte Plasmid-DNA intakt verbleibt (keine freien 5'- oder 3'-Enden). Die Reaktionsprodukte lassen sich entweder über elektrophoretische oder chromatographische Verfahren, aber auch durch eine Fällung reinigen. Zur Auswahl stehen hier unterschiedliche Reinigungsverfahren. Zum einen kann die
- 25 zyklisierte und mit dem Kopplungsagenz und dem Signalpeptid konjugierte Nukleinsäure mit einer Exonuklease, bevorzugt Exonuklease III, behandelt und anschließend über eine chromatographische, elektrophoretische Reinigung, bzw. eine Fällung gereinigt werden. Zum anderen kann auch die zyklisierte Plasmid DNA mit einer Exonuklease, bevorzugt Exonuklease III, behandelt, gereinigt und anschließend mit dem Kopplungsagenz und dem
-

Signalpeptid konjugiert und über eine chromatographische, elektrophoretische Reinigung, bzw. eine Fällung gereinigt werden.

Durch die Verwendung modifizierter Oligonukleotide kann die Verknüpfung mit einem Signalpeptid realisiert werden, das das Transformationsplasmid in das gewünschte
5 Zellkompartiment *in vivo* dirigiert. Zu diesem Zweck kann entweder das Transformationsplasmid zuerst mit dem modifizierten Oligonukleotid umgesetzt werden (Ligation) und danach die Konjugation mit dem Kopplungsagenz und dem Signalpeptid erfolgen, oder das modifizierte Oligonukleotid wird zuerst mit dem Kopplungsagenz und dem Signalpeptid konjugiert und anschließend für die Zyklisierung der Transformations-
10 plasmidenden eingesetzt (Ligation).

Die Überwindung der Zellmembran durch das Transformationssystem (zelluläre Transformation) kann über verschiedene Verfahren erfolgen. Es eignen sich hier das 'Particle-Gun' System oder die Mikroinjektion, bevorzugt aber die Elektroporation und die Lipotransfektion. Alle Methoden gewährleisten die Einbringung des linear-zyklischen
15 Peptid-Nukleinsäureplasmids in das Zytosol der Zelle, von wo aus das Plasmid durch das konjugierte Signalpeptid an seinen Wirkort (Zielkompartiment) dirigiert wird.

Gegenüber den in der Beschreibungseinleitung erwähnten Transformations- und Infektionsmethoden des Standes der Technik bietet dieses Verfahren erstmals die Möglichkeit, Nukleinsäuren zielgerichtet in Zellen und Zellorganellen einzuführen.
20 Welches Zielkompartiment dabei erreicht werden soll (Cytosol, Nukleus, Mitochondrium, Chloroplast, etc.) kann durch die Wahl der Signalsequenz bestimmt werden. Neben dem kompartiment- und zellspezifischen Einschleusungsverhalten zeichnet sich dieses Verfahren durch seine universelle Anwendbarkeit aus. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen und Zellsysteme können mit dem Translokationsvektor behandelt
25 werden. Da bei der zielgerichteten Einschleusung ein natürliches Transportsystem der Membranen benutzt wird, erübrigt sich die Behandlung der Zellen oder Zellorganellen mit membranpermeabilisierenden Agenzien (z.B. Calciumchlorid-Methode, s.o.).

Bei der Verwendung einer replikativen und transkriptionsaktiven Nukleinsäure, entfaltet das Plasmid erst nach der Vollendung des ersten Replikationszyklusses seine volle Größe: als echtes zyklisches Plasmid (künstliches Chromosom) verfügt es nun über die doppelte genetische Information (Kopf-Kopf verknüpfte Plasmiddimere). Insbesondere im Hinblick
5 auf die Verwendung dieses Systems für eine somatische Gentherapie ist dieses Verhalten bewußt induziert und von entscheidender Bedeutung, da die zu exprimierenden Gene mit den defekten Genen der Zellen kompetitieren müssen. Neben dieser höchstmöglichen Effektivität besteht das System dadurch, daß es nicht wie zum Beispiel retrovirale Systeme über einen Rekombinationsvorgang in ein Genom integriert werden muß, um
10 replikativ werden zu können. Dadurch werden unkontrollierbare Nebeneffekte (unerwünschte Rekombination) bereits im Vorfeld weitestmöglich unterdrückt. Die Anwendung dieses Plasmidsystems kann daher ohne großes Sicherheitsrisiko in Aussicht gestellt werden.

Die vorliegende Erfindung wird insbesondere durch die Figuren erläutert, welche zeigen:

15 **Fig. 1:** Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte, sowie eine für die Einschleusung geeignete DNA-Sequenz. Oben: Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte (32 Aminosäuren), verlängert um zehn N-terminale Aminosäuren des maturierten Proteins und ein zusätzliches Cystein als Kopplungsstelle. Dargestellt ist die Peptidsequenz im
20 internationalen Einbuchstabencode; Mitte: eine für die Einschleusung geeignete, partiell palindromische DNA-Sequenz aus 39 Nukleotiden mit einem aminomodifizierten T an Nukleotidposition 22; Unten: ausgeprägte Sekundärstruktur des Oligonukleotids mit überhängendem 5'-Ende und einem modifizierten Nukleotid im Scheitelpunkt des 'Loops'.

25 **Fig. 2:** Struktur des aminomodifizierten 2'-Deoxythymidin. R: Nukleinsäurereste.

- Fig. 3:** Schematische Darstellung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes, bestehend aus aminomodifiziertem Oligonukleotid (39 Nukleotide) mit ausgeprägtem 'Hairpin-Loop', Crosslinker und Signalpeptid. CL: Crosslinker.
- Fig. 4:** Elektrophoretische Auftrennung des Kopplungsproduktes aus aminomodifiziertem Oligonukleotid (39 Nukleotide), m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester (MBS) und Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte (42 Aminosäuren, verlängert um ein Cystein am C-Terminus).
- Fig. 5a:** Ablaufdiagramm der Peptid-DNA-Fusion, Klonierung, Amplifizierung und Kopplung des einzuschleusenden transkribierbaren und prozessierbaren mitochondrialen tRNA-Gens (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465). CL: Crosslinker (MBS); MCS: Multiple Klonierungsstelle von pBluescript^R (Stratagene); mtTF: Bindungsstelle des mitochondrialen Transkriptionsfaktors; RNA-Pol: Bindungsstelle der mitochondrialen RNA-Polymerase; tRNA Leucin: Gen der mitochondrialen transfer RNA für Leucin (UUR); *Sac II*, *Apa I*, *Eco RI*: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; Nummerierung der klonierten mitochondrialen Sequenzen erfolgte in Anlehnung an die veröffentlichte Sequenz des menschlichen mitochondrialen Genoms (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465).
- Fig. 5b:** Sequenz des klonierten tRNA^{Leu(UUR)}-Gens.
- Fig. 6a/b:** Darstellung der ³²P-Strahlung der DNA, sowie der Enzymaktivitäten für Adenylat-Kinase, Cytochrom c-Oxidase und Malat-Dehydrogenase (y-Achsen) in 11 Fraktionen (x-Achsen) einer Mitochondrien-Sucrosegradientendichtezentrifugation. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Strahlung/

Enzymaktivität, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Gesamtstrahlung/Enzymaktivität, die auf den Gradienten aufgetragen wurde. ADK: Adenylat-Kinase; COX: Cytochrom c-Oxidase; MDH: Malat-Dehydrogenase.

5 **Fig. 7a/b:** Darstellung der ^{32}P -Strahlung der DNA, sowie der Enzymaktivitäten für Adenylat-Kinase, Cytochrom c-Oxidase und Malat-Dehydrogenase (y-Achsen) in 11 Fraktionen (x-Achsen) einer Mitoplasten-Sucrosegradientendichtezentrifugation. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Strahlung/Enzymaktivität, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Gesamtstrahlung/Enzymaktivität, die auf den Gradienten aufgetragen wurde. ADK: Adenylat-Kinase; COX: Cytochrom c-Oxidase; MDH: Malat-Dehydrogenase.

10

Fig. 8: Klonierung des Nukleinsäureanteils des Peptid-Nukleinsäure-Plasmids in pBluescript (Plasmid 1). Unter Verwendung der zwei Oligonukleotide (Primer 1 und 2) wurde aus mitochondrialer HeLa-DNA der Genabschnitt von Nukleotid 15903 bis Nukleotid 677 enzymatisch amplifiziert (beinhaltet: Promotor, gekennzeichnet durch die Bindungsstellen für die mitochondrialen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase; Replikationsursprung, gekennzeichnet durch die sogenannten 'conserved sequence blocks'; Regulation der DNA-Replikation, gekennzeichnet durch die 'TAS'-Motive). Da die Oligonukleotide Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xho* I und *Pst* I enthalten, können die Enden des amplifizierten Nukleinsäure so modifiziert werden, daß sie zum einen kompatibel zu einem Vektorarm von pBluescript, zum anderen kompatibel zu dem Hybrid der Oligonukleotide MCS/TTS 1 und 2 sind. Diese beinhalten neben einer multiplen Klonierungsstelle auch eine Transkriptions-Terminationssequenz, die für die regulierte Transkription verantwortlich ist. Das Ligationsprodukt wird anschließend in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Im Anschluß an die Plasmid-Isolierung inserttragender *E. coli* Kolonien wurden die Nukleinsäuren einer RFLP- und Sequenzanalyse unterzogen.

15

20

25

Fig. 9: Sequenz der Oligonukleotide MCS/TTS 1 und 2. Die Oligonukleotide MCS 1 und 2 wurden synthetisch hergestellt und beinhalten Erkennungssequenzen für neun verschiedene Restriktionsendonukleasen, sowie ein Sequenzmotiv, welches die Transkription bidirektional zu unterbinden vermag. Die Oligonukleotide sind komplementär und können dadurch ein Hybrid ausbilden. Die überhängenden Enden sind Teil der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Bam* HI.

Fig. 10: Nukleotidsequenz des Nukleinsäureanteils des Peptid-Nukleinsäureplasmids (Plasmid 1).

Fig. 11: Klonierung des Reportergens in den Nukleinsäureanteil des Peptid-Nukleinsäureplasmids in pBluescript (Plasmid 2). Unter Verwendung der zwei Oligonukleotide (Primer 3 und 4) wurde aus einem DNA-Extrakt einer menschlichen CAP-resistenten Zelllinie der Genabschnitt von Nukleotid 1562 bis Nukleotid 3359 enzymatisch amplifiziert (beinhaltet: Teil des 12 S rRNA Gens, tRNA^{Val}-Gen, 16 S rRNA^{CAP+}-Gen, tRNA^{Leu}-Gen, Teil des ND 1-Gens). Da die Oligonukleotide Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Bcl* I enthalten, können die Enden der amplifizierten Nukleinsäure so modifiziert werden, daß sie kompatibel zu der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Peptid-Nukleinsäure-Plasmids sind (Plasmid 1). Das Ligationsprodukt wird anschließend in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Im Anschluß an die Plasmid-Isolierung insertrager *E. coli* Kolonien wurden die Nukleinsäuren einer RFLP- und Sequenzanalyse unterzogen und stehen für die beschriebenen Experimente zur Verfügung.

Fig. 12: Nukleotidsequenz des Nukleinsäureanteils des Peptid-Nukleinsäure-Plasmids inklusive des Reportergens (Plasmid 2).

Fig. 13a: Reaktionsablauf der Zyklisierung des Nukleinsäureanteils, sowie die Konjugation des Nukleinsäureanteils mit einem Signalpeptid. Der Nukleinsäureanteil des Peptid-Nukleinsäureplasmids kann über eine Plasmidpräparation oder eine enzymatische Amplifizierung gewonnen werden. In beiden Fällen führt die Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *Bsa* I zu einem ligationsfähigen Zwischenprodukt. Dieses kann direkt mit den monomerisierten 'hairpin-loops' umgesetzt werden. Das Reaktionsprodukt wird durch eine Exonuklease III Behandlung von unspezifischen (nicht zyklischen) Reaktionsprodukten und Edukten abgetrennt, gereinigt und über einen Crosslinker mit dem Signalpeptid konjugiert. Alternativ kann einer der beiden 'hairpin-loops' zuerst über einen Crosslinker mit dem Signalpeptid konjugiert werden, bevor die zyklisierende Ligation durchgeführt wird. Auch hier schließt sich eine Reinigung des Reaktionsproduktes durch eine Exonuklease III Behandlung an.

Fig. 13b: Struktur und Sequenz der 'hairpin-loop' Oligonukleotide HP 1 und 2.

Fig. 14: Monomerisierung eines 'hairpin-loop'-Oligonukleotids. Die synthetischen 'hairpin-loops' HP 1 und 2 können durch eine thermische oder alkalische Denaturierung monomerisiert werden. Dargestellt ist in dieser Figur ein Standard-Agarosegel: Spur 1, Molekulargewichtsstandard (Φ X 174 RF DNA behandelt mit der Restriktionsendonuklease *Hae* III); Spur 2: HP 1, Syntheseprodukt; Spur 3: HP 1, thermisch monomerisiert.

Fig. 15a: Ligationen zwischen dem Nukleinsäureanteil des Peptid-Nukleinsäureplasmids (Plasmid 2) und den 'hairpin-loops' HP 1 und 2. Dargestellt ist in dieser Figur ein Standard-Agarosegel: Spur 1, klonierter Nukleinsäureanteil des Peptid-Nukleinsäureanteils in pBluescript behandelt mit der Restriktionsendonuklease *Bsa* I; Spur 2: Ligation der Reaktionsprodukte aus Spur 1 mit den 'hairpin-loops' HP 1 und 2; Spur 3,

Behandlung der Reaktionsprodukte aus Spur 2 mit Exonuklease III; Spur 4, Molekulargewichtsstandard (λ DNA behandelt mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Eco* RI).

Fig. 15b: Überprüfung des gereinigten Ligationsproduktes durch eine *Mae* III-RFLP Analyse. Dargestellt ist in dieser Figur ein Standard-Agarosegel: Spur 1, enzymatisch amplifizierter Nukleinsäureanteil nach einer *Mae* III-Behandlung; Spur 2: gereinigtes Ligationsprodukt des enzymatisch amplifizierten Nukleinsäureanteils nach einer *Mae* III-Behandlung; Spur 3: gereinigtes Produkt der Plasmid-DNA-Ligation nach einer *Mae* III-Behandlung; Spur 4, Molekulargewichtsstandard (Φ X 174 RF DNA behandelt mit der Restriktionsendonuklease *Hae* III).

Fig. 16: Transkription und Replikation des Peptid-Nukleinsäureplasmids. Dargestellt ist in dieser Figur ein Standard-Agarosegel: Spur 1, Molekulargewichtsstandard (λ DNA behandelt mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Eco* RI); Spur 2, unbehandeltes Peptid-Nukleinsäureplasmid; Spur 3: *in vitro* erhaltene Transkriptionsprodukte des Peptid-Nukleinsäureplasmids, Spur 4: *in vitro* erhaltene Replikations- und Transkriptionsprodukte des Peptid-Nukleinsäureplasmids; Spur 5, *in vivo* erhaltene Replikations- und Transkriptionsprodukte des Peptid-Nukleinsäureplasmids; Spur 6, unbehandeltes Peptid-Nukleinsäureplasmid.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der nachfolgenden Beispiele erläutert, die die Erfindung jedoch in keinster Weise beschneiden sollen.

Beispiel 1:

Einführung eines chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes in die Mitochondrien

Um den Nachweis erbringen zu können, daß Nukleinsäuren durch das oben beschriebene Verfahren zielgerichtet durch Membranen transportiert werden können, wurde die

- Überwindung des mitochondrialen Doppelmembransystems mit einem DNA-Translokationsvektor studiert. Dazu wurde die mitochondriale Signalsequenz der Ornithintranscarbamylase (A.L. Horwich *et al.* (1983), "Molecular cloning of the cDNA coding for rat ornithine transcarbamoylase", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 4258-4262)
- 5 (Enzym des Harnstoffzyklus, natürlicherweise in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert) chemisch hergestellt und gereinigt. Als reaktive Gruppe zur späteren Verbindung mit der DNA wurde die Originalsequenz um ein Cystein am C-Terminus erweitert (siehe Figur 1). Damit wurde gewährleistet, daß die Kopplung des heterobifunktionellen Crosslinkers (MBS) nur an die Thiol-Gruppe des einzigen Cysteins erfolgen kann. Als
- 10 Verknüpfungspartner wurde ein DNA-Oligonukleotid (39 Nukleotide) ausgewählt, das sich durch zwei besondere Merkmale auszeichnet:
1. Die Sequenz ist partiell palindromisch mit einem überhängenden, phosphorylierten 5'-Ende (siehe Figur 1). Dadurch kann sich ein sogenannter 'hairpin-loop' ausbilden. Das überhängende 5'-Ende dient dazu, definierte Nukleinsäuren an dieses
 - 15 Oligonukleotid zu ligieren, die dann in die Mitochondrien importiert werden können.
 2. Das Oligonukleotid trägt im Scheitelpunkt des 'Loops' eine modifizierte Base (siehe Figur 1). Es handelt sich dabei um ein aminomodifiziertes 2'-Deoxythymidin (siehe Figur 2). Die Aminofunktion der modifizierten Base ermöglicht dabei die Kopplungsreaktion zwischen MBS und Oligonukleotid.
- 20 Die Verknüpfung der drei Reaktionspartner (Oligonukleotid, MBS und Peptid) erfolgt in einzelnen Reaktionsschritten. Zuerst wird das Oligonukleotid (50 pmol) in einem Puffer (100 µl; 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.6) zusammen mit MBS (10 nmol gelöst in DMSO) umgesetzt (Reaktionszeit: 60 min.; Reaktionstemperatur: 20°C). Nicht umgesetztes MBS wird über eine 'Nick-Spin-Column^R' (Sephadex G 50, Pharmacia), die mit 50 mM
- 25 Kaliumphosphat (pH 6.0) equilibriert wurde, abgetrennt. Das Eluat enthält das gewünschte Reaktionsprodukt und wird in einem weiteren Reaktionsschritt mit dem Peptid (2.5 nmol) umgesetzt (Reaktionszeit: 60 min.; Reaktionstemperatur: 20°C). Abgestoppt wurde die

Reaktion durch die Zugabe von Dithiothreitol (2 mM). Das Kopplungsprodukt (Chimäre, siehe Figur 3) wurde über eine präparative Gelelektrophorese von nicht umgesetzten Edukten abgetrennt und durch eine Elektroelution aus dem Gel isoliert (siehe Figur 4). An das überhängende 5'-Ende des Oligonukleotids lassen sich nun durch einfache Ligation
5 unterschiedliche Nukleinsäuren ankoppeln.

Für das im Folgenden beschriebene Experiment wurde eine 283 bp lange doppelsträngige DNA (dsDNA) über eine enzymatische Reaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrizen DNA diente dazu ein in pBluescript^R (Stratagene) kloniertes DNA-Fragment, das neben dem menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L, nt 902 - nt 369) das
10 Gen für die mitochondriale transfer RNA Leucin (tRNA^{Leu(UUR)}, nt 3204 - nt 4126) enthielt (siehe Figur 5). Als Amplifizierungsprimer dienten zwei Oligonukleotide, wobei Primer 1 über ein nichtkomplementäres 5'-Ende verfügte (siehe Figur 5). Die Modifikation der dsDNA erfolgte durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase (Inkubation in Gegenwart von 1 mM dGTP), die unter dem Fachmann bekannten
15 Bedingungen überhängende 5'-Enden erzeugen kann (C. Aslanidis *et al.* (1990), "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)", *Nucleic. Acids. Res.* 18: 6069-6074).

Zusammen mit dem bereits konjugierten Peptid-MBS-Oligonukleotid konnte die PCR-amplifizierte DNA unter Verwendung der T4-DNA-Ligase zusammengefügt werden.
20 Um die Verknüpfungspartner nach der Einbringung in die Mitochondrien einfach detektieren zu können, wurde die freie 5'-OH Gruppe der ligierten DNA durch eine enzymatische Reaktion radioaktiv phosphoryliert (A. Novogrodsky *et al.* (1966), "The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. I. Phosphorylation at 5'-hydroxyl termini", *J. Biol. Chem.* 241: 2923-2932; A. Novogrodsky
25 *et al.* (1966), "The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. II. Further properties of the 5'-hydroxyl polynucleotide kinase", *J. Biol. Chem.* 241: 2933-2943).

Für die Isolierung von Mitochondrien wurde eine frische Rattenleber zerkleinert, in 25 mM HEPES, 250 mM Saccharose, 2mM EDTA, 52 µM BSA suspendiert und in einem Glashomogenisator (50 ml) homogenisiert. Zellmembranen, Zelltrümmer und Zellkerne wurden bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand für eine weitere Zentrifugation
5 vorbereitet. Dazu wurde der Überstand in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und bei 8000 g zentrifugiert. Die isolierten Mitochondrien wurden in 200 ml desselben Puffers resuspendiert und erneut bei 8000 g zentrifugiert. Das saubere Mitochondrienpellet wurde in einem gleichen Volumen desselben Puffers resuspendiert und durch Zugabe von 25 mM Succinat, 25 mM Pyruvat und 15 mM Malat energetisiert. Der Proteingehalt der
10 Suspension wurde über einen Bradford-Testkit^R (Pierce) bestimmt. 200 µg mitochondriales Protein (energetisierte Mitochondrien) wurden zusammen mit 10 pmol des Chimären bei 37°C für 60 min. inkubiert (0.6 M Sorbitol, 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 1 % BSA). Die Mitochondrien wurden durch eine Zentrifugation bei 8000 g reisoliert, in 0.6 M Sorbitol, 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 % BSA, 10
15 U/ml DNase I resuspendiert und 30 min. bei 37°C inkubiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt, um unspezifisch anhaftende Moleküle zu entfernen. Zum Nachweis, daß das Chimäre mit den Mitochondrien assoziiert ist, wurden die reisolierten Mitochondrien über eine Sucrosegredientendichtezentrifugation aufgereinigt. Zur Lokalisierung des Chimären und der Mitochondrien wurden die einzelnen Fraktionen des
20 Gradienten analysiert. Als Marker der Mitochondrien wurde die Adenylat-Kinase, die Cytochrom-c Oxidase und die Malat-Dehydrogenase Aktivität bestimmt, während das Chimäre über die Messung der ³²P-Strahlung identifiziert werden konnte (siehe Figur 6). Ein analoges Experiment zur Bestimmung des unspezifischen DNA-Einbaus wurde mit der gleichen DNA ausgeführt, die nicht mit dem Signalpeptid verbunden war (siehe Figur
25 6). Aus den Messungen wurde abgeleitet, daß 65 % des eingesetzten Chimären spezifisch mit den Mitochondrien segregierte, während der unspezifische DNA Einbau weniger als 5 % der eingesetzten DNA betrug. Um zu zeigen, daß das Chimäre nicht nur mit der Oberfläche der Mitochondrien (Membran, Import-Rezeptor) assoziiert ist, wurden die reisolierten Mitochondrien in die drei Kompartimente äußere
30 Mitochondrienmembran/Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran und

Matrixraum fraktioniert. Dazu wurden die Mitochondrien mit Digitonin (Endkonzentration: 1.2 % w/v Digitonin) inkubiert und die entstandenen Mitoplasten über eine Sucrosegradientendichtezentrifugation aufgetrennt, in Fraktionen gesammelt und die Aktivitäten von Markerenzymen (Adenylat-Kinase: Intermembranraum; Cytochrom c Oxidase: innere Mitochondrienmembran; Malat-Dehydrogenase: Matrixraum) nach Schnaitmann und Greenawalt (C. Schnaitman *et al.* (1968), "Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria", J. Cell Biol. **38**: 158-175; C. Schnaitman *et al.* (1967), "The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria", J. Cell Biol. **32**: 719-735) bestimmt (siehe Figur 7). Ein analoges Experiment zur Bestimmung des unspezifischen DNA-Einbaus wurde mit der gleichen DNA ausgeführt, die nicht mit dem Signalpeptid verbunden war (siehe Figur 7). Aus den Messungen wurde abgeleitet, daß 45% des Chimären mit den Mitoplasten assoziiert ist, während die unspezifisch anhaftende DNA mit weniger als 3 % abgeschätzt werden konnte. Die isolierten Mitoplasten (Verlust der äußeren Membran und des Intermembranraums) wurden durch Lubrol^R (0.16 mg/mg Protein; ICN) lysiert und durch eine Ultrazentrifugation bei 144000 g in die Kompartimente innere Mitochondrienmembran (Pellet) und Matrixraum (Überstand) getrennt. Die Zuordnung der Kompartimente erfolgte über die Messung der Aktivitäten der Cytochrom-c Oxidase (innere Mitochondrienmembran) und der Malat-Dehydrogenase (Matrixraum). Die Messung des Chimären erfolgte über die Detektierung der ³²P-Strahlung im Szintillationszähler und ergab zu 75 % eine Segregation mit der Matrix der Mitochondrien, während 25 % des Chimären mit der inneren Membran der Mitochondrien assoziiert blieb (unvollständige Translokation).

Beispiel 2:

25 Einführung eines replikativen und transkriptionsaktiven chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes (Plasmid) in die Mitochondrien lebender Zellen

Um den Nachweis erbringen zu können, daß ein lineares Peptid-Nukleinsäure-Plasmid mit zyklisierten Enden ('hairpin-loops') Membranen in vivo über die Protein-Importroute

überwinden und trotz der chemischen Kopplung mit einem Signalpeptid transkribiert und repliziert werden kann, wurde das Transkriptions- und Replikationsverhalten nach der Transfektion von Zellen und dem Import in die Matrix der Mitochondrien studiert. Dazu wurde das Signalpeptid der mitochondrialen Ornithintranscarbamylase synthetisch
5 hergestellt, gereinigt und mit einem Nukleinsäure-Plasmid verknüpft.

Voraussetzung für die Überprüfung des korrekten Transkriptions- und Replikationsverhaltens ist die physikalische Struktur des Plasmids: für das im folgenden beschriebene Experiment wurde eine 3232 bp lange doppelsträngige Vektor-DNA (dsDNA) in pBluescript^R (Stratagene) kloniert. Dazu wurde der Bereich des
10 mitochondrialen Genoms über zwei modifizierte Oligonukleotide amplifiziert (Primer 1, hybridisiert mit den Nukleotiden 15903-15924 der menschlichen mtDNA, beinhaltet am 5'-Ende eine Verlängerung um die Sequenz TGTA Gctgcag zur Einführung einer *Pst* I-Schnittstelle; Primer 2, hybridisiert mit den Nukleotiden 677-657 der menschlichen mtDNA, beinhaltet am 5'-Ende eine Verlängerung um die Sequenz
15 TTGCATGctcgagGGTCTCAGGG zur Einführung einer *Xho* I-Schnittstelle), der den Promotor des leichten DNA-Stranges, den Ursprung der mtDNA-Replikation des schweren Stranges, die Regulationsmotive für die Transkription (CSB's, 'conserved sequence blocks'), sowie die Regulationsstelle für die DNA Replikation ('TAS', termination associated sequences, (D.C. Wallace (1989), "Report of the committee on human
20 mitochondrial DNA", Cytogenet. Cell Genet. 51: 612-621) enthielt (siehe Figur 8). Hinter diesem Fragment (3'-Richtung) wurde eine multiple Klonierungsstelle eingefügt, die ein einfaches Verknüpfen mit einem zu exprimierenden Gen erlauben soll. Die multiple Klonierungsstelle (MCS/TTS) wurde über eine chemische Synthese von zwei komplementären Oligonukleotiden erzeugt (MCS/TTS 1 und 2), die Erkennungssequenzen
25 für verschiedene Restriktionsendonukleasen enthalten (siehe Figur 9). Unter dem Fachmann bekannten Bedingungen bilden die beiden Oligonukleotide Hybride, die nach Phosphorylierung mit T4 DNA Polynukleotidkinase für die Ligation eingesetzt werden können. Die Hybride zeichnen sich in diesem Zusammenhang durch 5'- und 3'-einzelstrangüberhängende Enden aus, die zum einen komplementär zu einer *Pst* I, zum

anderen komplementär zu eine *Bam* HI Schnittstelle sind (siehe Figur 9). Zusammen mit der multiplen Klonierungsstelle beinhalten die synthetischen Oligonukleotide MCS/TTS 1 und 2 auch eine bidirektionale mitochondriale Transkriptions-Terminationssequenz (siehe Figur 9). Sie ist in 3'-Richtung zur MCS angeordnet und gewährleistet, daß die
5 Transkription an dieser Stelle unterbrochen wird und damit korrekt terminierte Transkripte entstehen. Außerdem gewährleistet dieses Sequenzmotiv, daß im zyklischen Plasmidsystem keine 'Antisense-RNA' exprimiert wird. Die Ligationsreaktion zwischen pBluescript, PCR-amplifiziertem Fragment und der MCS/TTS-Hybride erfolgte in einer
10 Stöchiometrie von 1:2:2 unter dem Fachmann bekannten Bedingungen. Nach der Transformation konnten mehrere *E. coli* Kolonien (Klone) isoliert und charakterisiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Plasmid-DNA unter dem Fachmann bekannten Bedingungen einer Didesoxysequenzierung (Figur 10) unterworfen.

Für die experimentelle Überprüfung der Replikation und Transkription wurde in die multiple Klonierungsstelle ein sogenanntes Reportergen eingefügt. Als Reportergen wurde
15 die chloramphenicolresistente menschliche mitochondriale 16 S ribosomale RNA ausgewählt, die sich von der natürlich auftretenden ribosomalen RNA nur durch ein modifiziertes Nukleotid unterscheidet (Polymorphismus). Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion wurde aus einem DNA-Extrakt chloramphenicolresistenter HeLa-Zellen ein
20 Fragment mit zwei modifizierten Oligonukleotiden (Primer 3, hybridisiert mit den Nukleotiden 1562-1581 der mitochondrialen DNA, am 5'-Ende um die Sequenz CCTCTaagctt zur Einführung einer *Hind* III-Schnittstelle verlängert; Primer 4, hybridisiert mit den Nukleotiden 3359-3340, am 5'-Ende um die Sequenz GCATTactagt zur
Einführung einer *Bcl* I-Schnittstelle verlängert) unter dem Fachmann bekannten Bedingungen amplifiziert. Um eine korrekte Prozessierung des späteren Transkriptes zu
25 gewährleisten, umfasste das Amplifizierungsprodukt die beiden flankierenden tRNA-Gene (tRNA^{Val} und tRNA^{Leu}). Die amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Bcl* I behandelt, durch eine Fällung gereinigt und mit dem mit *Hind* III und *Bcl* I behandelten pBluescript-Plasmid 1 (siehe Figur 8, 9, und 10) in einer Stöchiometrie

von 1:1 in einer Ligationsreaktion unter dem Fachmann bekannten Bedingungen eingesetzt. Die Klonierungsstrategie ist in Figur 11 dargestellt.

- Mehrere *E. coli* Kolonien (Klone) konnten isoliert und charakterisiert werden. Dazu wurde die entsprechende Plasmid-DNA unter dem Fachmann bekannten Bedingungen einer
- 5 Didesoxysequenzierung unterworfen (siehe Figur 12). Um die klonierte DNA für die Anwendung an Zellkulturen und Mitochondrien vorzubereiten, wurde das Klonierungsinsert (mitochondriales Transformationsplasmid) durch die Verwendung der Restriktionsendonuklease *Bsa* I von dem pBluescript-Vektor unter dem Fachmann bekannten Bedingungen abgetrennt. Alternativ konnte die Insert-DNA über zwei
- 10 Oligonukleotide (Primer 2 und 5; Nukleotidsequenz von Primer 5: GATCCGGTCTCATTTTATGCG) durch die Polymerase Kettenreaktion amplifiziert werden. Bei der Verwendung von S-dNTPs erlaubt die Herstellung von 'thionierter' DNA, die gegenüber zellulären Nukleasen stabilisiert ist. In beiden Fällen führt die anschließende Verwendung der Restriktionsendonuklease *Bsa* I zu zwei unterschiedlichen
- 15 5'-Überhängen. Diese sind zu den verwendeten 'Hairpin-loops' komplementär, um eine Zyklisierung der linearen Nukleinsäure zu erreichen (siehe Figur 13a und b). Die Oligonukleotide werden über eine chemische Synthese hergestellt. Dadurch besitzen sie keine phosphorylierten 5'-Enden und müssen durch eine Kinase-Reaktion unter dem Fachmann bekannten Bedingungen phosphoryliert werden (um später die zelluläre
- 20 Transformation überprüfen zu können, wurde zum Teil bei dieser Reaktion [γ - 32 P]-ATP als Substrat verwendet, um das Plasmid radioaktiv zu markieren). Die 'hairpin-loop'-Struktur der Oligonukleotide bildet sich zu einem großen Anteil spontan aus, da die palindromische Sequenz in der Lage ist mit sich selbst zu hybridisieren. Dimere der 'hairpin-loops' können aber auch in Monomere überführt werden, indem sie in einem möglichst großen Volumen
- 25 ($<0.1 \mu\text{M}$) mindestens 5 min. bei 93°C denaturiert und sofort durch Einfrieren in einer festen Matrix fixiert werden. Anschließend werden die Oligonukleotide langsam bei 4°C aufgetaut und liegen dann zu 99 % in der gewünschten monomeren 'hairpin-loop'-Struktur vor (siehe Figur 14).

Die Zyklisierung der Plasmid-DNA erfolgte zusammen mit den beiden monomerisierten 'hairpin-loops' (HP 1 und 2) in einem Reaktionsansatz. Das molare Verhältnis von Plasmid-DNA zu den beiden 'hairpin-loops' lag dabei bei 1:100:100 (Plasmid:HP1:HP2). Unter Verwendung der T4-DNA-Ligase konnten die einzelnen Reaktionspartner unter dem

5 Fachmann bekannten Bedingungen zusammengefügt werden (siehe Figur 15). Die Reinigung der Ligationsprodukte erfolgte durch eine Behandlung mit Exonuklease III (Reaktionsbedingungen: 37°C, 60 min.). Während Nukleinsäuren mit freien 3'-Enden durch die Nuklease abgebaut werden, bleibt die mit den beiden 'hairpin-loops' verbundene Plasmid DNA gegenüber der 3'-5'-Exonuklease Aktivität des Enzyms stabil. Das einzige

10 Reaktionsprodukt (siehe Figur 15a) wurde über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch eine Elektroelution oder unter Verwendung von QIAquick (Qiagen) nach Empfehlung des Herstellers gereinigt.

Die Überprüfung des Ligationsproduktes erfolgte über eine RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus). Dazu wurde die ligierte und gereinigte

15 Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease *Mae* III unter dem Fachmann bekannten Bedingungen behandelt. Die DNA verfügt über fünf Spaltstellen, so daß Fragmente unterschiedlicher Größen entstehen, die über ein Agarosegel (4 %) analysiert werden können. Figur 15b zeigt exemplarisch das *Mae* III-Spaltmuster, daß nach der Ligation der Plasmid-DNA mit den beiden 'hairpin-loops' erhalten wird. Die mit Pfeilspitzen markierten

20 DNA-Banden representieren dabei das linke und das rechte Ende des amplifizierten (Spur 1) und des linear-zyklischen (Spur 2 und 3) mitochondrialen Plasmids.

Zur Konjugation des zirkularisierten Plasmids mit dem synthetischen Signalpeptid der Ratten-Ornithintranscarbamylase (H_2N -MLSNLRILLNKAALRKAHTSMVRNFRYGGK-PVQSQVQLKPRDLC-COOH) wurde die Nukleinsäure mit dem 20 fachen molaren

25 Überschuß an m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimdeste (Kopplungsagenz) für 60 min. bei 20°C (Inkubationsmedium: 50 mM Kaliumphosphat pH 7.8) inkubiert. Das überschüssige Kopplungsagenz wurde durch eine 'Nick-Spin-Säule' (Pharmacia-LKB) unter dem Fachmann bekannten Bedingungen abgetrennt. Die Konjugation der 'aktivierten'

Nukleinsäure erfolgte durch die Umsetzung der Nukleinsäure mit dem 50-fachen molaren Überschuß des Signalpeptids bei 20°C (Inkubationsmedium: 50 mM Kaliumphosphat pH 6.8). Nach 45 min. wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 mM Dithiothreitol beendet und das Konjugat stand für die folgenden Experimente zur Verfügung.

- 5 Um die Verwendbarkeit des Peptid-Nukleinsäure-Plasmids *in vivo* zeigen zu können, mußte das Plasmid in eukaryotische Zellen eingeschleust werden. Dazu wurde eine chloramphenicolsensitive B-Lymphozyten- oder Fibroblastenzellkultur über eine Lipotransfektion mit dem Peptid-Nukleinsäure-Plasmid transfiziert: 1 µg des radioaktiv markierten Peptid-Nukleinsäure-Plasmids (die Markierung wurde als ³²P-Markierung
- 10 während der Kinase-Reaktion des 'hairpin-loops' (HP1) eingeführt) wurde zusammen mit 2-6 µl LipofectAmine^R (Gibco-BRL) in 200 µl serumfreiem Optimem^R (Gibco-BRL) vorinkubiert (15 min., 20°C). Während der Inkubation bildet das polykationische Lipid des LipofectAmine^R Reagenz DOSPA (2,3-Dioleoyloxy-N-[2-(spermincarboxamido)-ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetat) mit der Unterstützung des neutralen Lipids
- 15 DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) unilamellare Liposomen aus, die die DNA zu komplexieren vermögen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zu den vorbereiteten Zellen gegeben, die auf eine Dichte von ca. $2.5 \cdot 10^6$ Zellen pro 0.8 ml eingestellt worden waren (35 mm Kulturschalen, 4 h, 37°C, CO₂ Inkubator). Das Transfektionsmedium wurde anschließend durch 5 ml DMEM Medium (Gibco-BRL) ersetzt, das zuvor mit 10 %
- 20 fötalem Kälberserum und 100 µg/ml Chloramphenicol supplementiert wurde. Die Transformationseffizienz wurde durch Messung der ³²P-Strahlung des Konstrukts bestimmt. In der Regel wurde eine zelluläre Einbaurate von 80-85 % gemessen. Dies bedeutet, daß 80-85 % des chimären Konstruktes mit den transformierten Zellen assoziiert waren und 15-20 % des chimären Peptid-DNA-Plasmids im Überstand der
- 25 Transfektionsreaktion verblieben.

Nach ca. 21-28 Tagen bildeten sich in den transformierten Zellen chloramphenicolresistente Kolonien aus. Unter dem Fachmann bekannten Bedingungen wurden die resistenten Zellen vereinzelt und vermehrt. Aus ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen konnte unter

dem Fachmann bekannten Bedingungen ausreichend DNA gewonnen werden, um eine Genotypisierung vorzunehmen. Dazu wurde die isolierte DNA über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (Southern-blot). Die Nukleinsäuren wurden über eine Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde detektiert (siehe Figur 16). Neben dem eingeführten zirkularisierten 'linearen' Vektor (Spur 2 und 6) sind in dieser Abbildung eine 'in vitro' Transkription (Spur 3), eine 'in vitro' Replikation (Spur 4), sowie die 'in vivo' erhaltenen Intermediate (isolierte Nukleinsäuren eines transformierten Klons) dargestellt. Während die drei kleineren Banden in vitro durch die Inkubation des zirkularisierten Vektors mit den vier Nukleosidtriphosphaten (RNA) und eines mitochondrialen Enzymextraktes erzeugt werden können (Spur 3), beobachtet man bei der zusätzlichen Zugabe der Desoxynukleosidtriphosphate zum Reaktionsansatz die Entstehung eines Dimeren, zirkulären Plasmids (größte Bande in Spur 4): ein identisches Bild ergibt sich bei der Analyse der Nukleinsäuren, die aus transformierten Zellkolonien gewonnen werden können (Spur 5). Daß es sich bei der größten DNA-Bande in Spur 4 und 5 tatsächlich um das dimere und daher replizierte mitochondriale Plasmid handelt, konnte durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden.

Als Kontrollexperiment diente ein Lipotransfektionsansatz, bei dem das unkonjugierte, nicht mit dem Signalpeptid verbundene, Plasmid eingesetzt wurde. Wie erwartet, wurde dieses Plasmid nicht in die Mitochondrien der transfizierten Zellen aufgenommen und führte demzufolge nicht zur Ausbildung chloramphenicolresistenter Zellen. Diese Zellen stellten das Wachstum nach 10 Tagen ein und starben innerhalb der darauffolgenden 8 bis 10 Tage vollständig ab.

Patentansprüche

- 1) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment umfassend:
 - (a) Zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Signalpeptid ausgenommen eine KDEL-Signalsequenz,
 - 5 (b) Kopplungsagenz,
 - (c) Nukleinsäure (Oligonukleotid),wobei die Kopplung des Signalpeptids über das Kopplungsagenz erfolgt, das über Aminosäuren am Carboxy-terminalen Ende des Signalpeptides mit diesem verbunden ist, wodurch die zielgerichtete Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen gewährleistet wird.
10
 - 2) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus mindestens zwei Basen besteht.
 - 3) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure über eine hybridisierungsfähige
15 Sekundärstruktur verfügt.
 - 4) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure über eine palindromische Sequenz verfügt.
 - 5) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure einen 'hairpin-loop' ausbilden kann.
 - 20 6) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure mit sich selbst hybridisieren und ein überhängendes 3'- oder 5'-Ende ('sticky end') ausbilden kann.
-

-
- 7) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Ribonukleinsäure, bevorzugt um eine Desoxyribonukleinsäure handelt.
- 8) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,
5 daß die Nukleinsäure chemisch modifizierte 'Phosphorthioat' Bindungen besitzt.
- 9) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine reaktive Kopplungsgruppe trägt.
- 10) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
10 daß die reaktive Kopplungsgruppe eine Aminofunktion enthält, wenn das Kopplungsagenz eine aminoreaktive Gruppierung enthält.
- 11) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Kopplungsgruppe eine Thiofunktion enthält, wenn das Kopplungsagenz eine thiolreaktive Gruppierung enthält.
- 12) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 10 oder 11,
15 dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppierung mindestens über einen C2-Spacer, bevorzugt aber einen C6-Spacer an die Nukleinsäure gebunden vorliegt.
- 13) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppierung am 3'-Hydroxy/Phosphat-Terminus oder am 5'-Hydroxy/Phosphat-Terminus der Nukleinsäure, bevorzugt aber an der
20 Base lokalisiert ist.
- 14) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 10-13, dadurch gekennzeichnet, daß an das 5'-Ende und/oder 3'-Ende definierte Nukleinsäuren, Antisense-Oligonukleotide, messenger RNAs oder transkribierbare und/oder replizierbare Gene angekoppelt werden.
-

-
- 15) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die anzukoppelnde Nukleinsäure chemisch modifizierte 'Phosphorthioat' Bindungen enthält.
- 5 16) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das anzukoppelnde Gen einen Promotor, bevorzugt einen mitochondrialen Promotor, enthält.
- 10 17) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid über eine reaktive Aminosäure am Carboxy-terminalen Ende, bevorzugt ein Lysin oder Cystein verfügt, wenn das Kopplungsagenz eine amino- oder thiolreaktive Gruppierung enthält.
- 18) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal trägt.
- 15 19) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid eine zell-, kompartiment- oder membranspezifische Peptidasespaltstelle besitzt.
- 20 20) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid aus dem kompartimentspezifisch spaltbaren Signalpeptid der menschlichen mitochondrialen Ornithintranscarbamylase, verlängert um ein künstliches Cystein am C-Terminus, besteht.
- 21) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-20, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz ein bifunktioneller, bevorzugt ein heterobifunktioneller Crosslinker ist.
-

-
- 22) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz thiolreaktive und/oder aminoreaktive Gruppierungen enthält, wenn das Signalpeptid und die Nukleinsäure Thiol- und/oder Aminogruppen als Kopplungsstellen tragen.
- 5 23) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-22, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxy-succinimidester oder ein Derivat desselben ist.
- 24) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-23, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekül unter Ausnutzung natürlicher
- 10 Transportmechanismen Membranen mit und ohne Membranpotential überwinden kann.
- 25) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment in Form eines linear zyklischen Plasmids, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid mindestens einen Replikationsursprung umfaßt und daß beide Enden des Nukleinsäureanteils zyklisiert sind, wobei
- 15 mindestens ein zyklisiertes Ende über ein modifiziertes Nukleotid verfügt, das über ein Kopplungsagenz an ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Signalpeptid gekoppelt werden kann.
- 26) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäureanteil weiter mindestens einen Promotor
- 20 umfaßt, bevorzugt einen mitochondrialen Promotor, ganz bevorzugt den mitochondrialen Promotor des leichten Stranges.
- 27) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25 und 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Neukleinsäureanteil weiter Transkriptions-Regulationssequenzen umfaßt, bevorzugt mitochondriale Transkriptions-
- 25 Regulationssequenzen.
-

-
- 28) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-27, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptions-Regulationssequenzen über mindestens eine Bindungsstelle eines Transkriptionsinitiationsfaktors verfügen.
- 29) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-28, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptions-Regulationssequenzen über mindestens eine Bindungsstelle für den RNA-Syntheseapparat verfügen, bevorzugt über die Bindungsstelle für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor 1 und die mitochondriale RNA-Polymerase.
- 30) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-29, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptions-Regulationssequenzen in 3'-Richtung zum Promotor angeordnet sind.
- 31) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-30, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulation der Transkription durch Elemente der mitochondrialen H- und L-Strang Transkriptionskontrolle übernommen wird.
- 32) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß als Transkriptionskontrollelemente die sogenannten 'conserved-sequence-blocks' der L-Strang Transkription fungieren.
- 33) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-32, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid weiter mindestens eine Transkriptions-Terminationsstelle umfaßt.
- 34) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-33, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptions-Terminationsstelle über eine Bindungssequenz eines mitochondrialen Transkriptions-Terminationsfaktors verfügt.
-

-
- 35) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Transkriptions-Terminationsstelle über die Bindungssequenz eines bevorzugt bidirektional-wirkenden Transkriptions-Terminationsfaktors verfügt.
- 5 36) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-35, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Replikationsursprung um einen mitochondrialen Replikationsursprung handelt, bevorzugt um den Replikationsursprung des schweren mtDNA-Stranges handelt, der über mindestens einen 'conserved sequence block' verfügt.
- 10 37) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-36, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid weiter mindestens eine Regulationssequenz für die Replikation umfaßt.
- 38) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-37, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Regulationssequenz für die Replikation um ein
15 mitochondriales Sequenzmotiv handelt.
- 39) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-38, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid weiter ein Selektionsgen umfaßt, bevorzugt ein Antibiotikaresistenzgen, bevorzugt das Oligomycin- oder Chloramphenicol-resistenzgen.
- 20 40) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-39, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid weiter eine multiple Klonierungsstelle enthält, die die Expression von 'Fremdgenen' zuläßt.
-

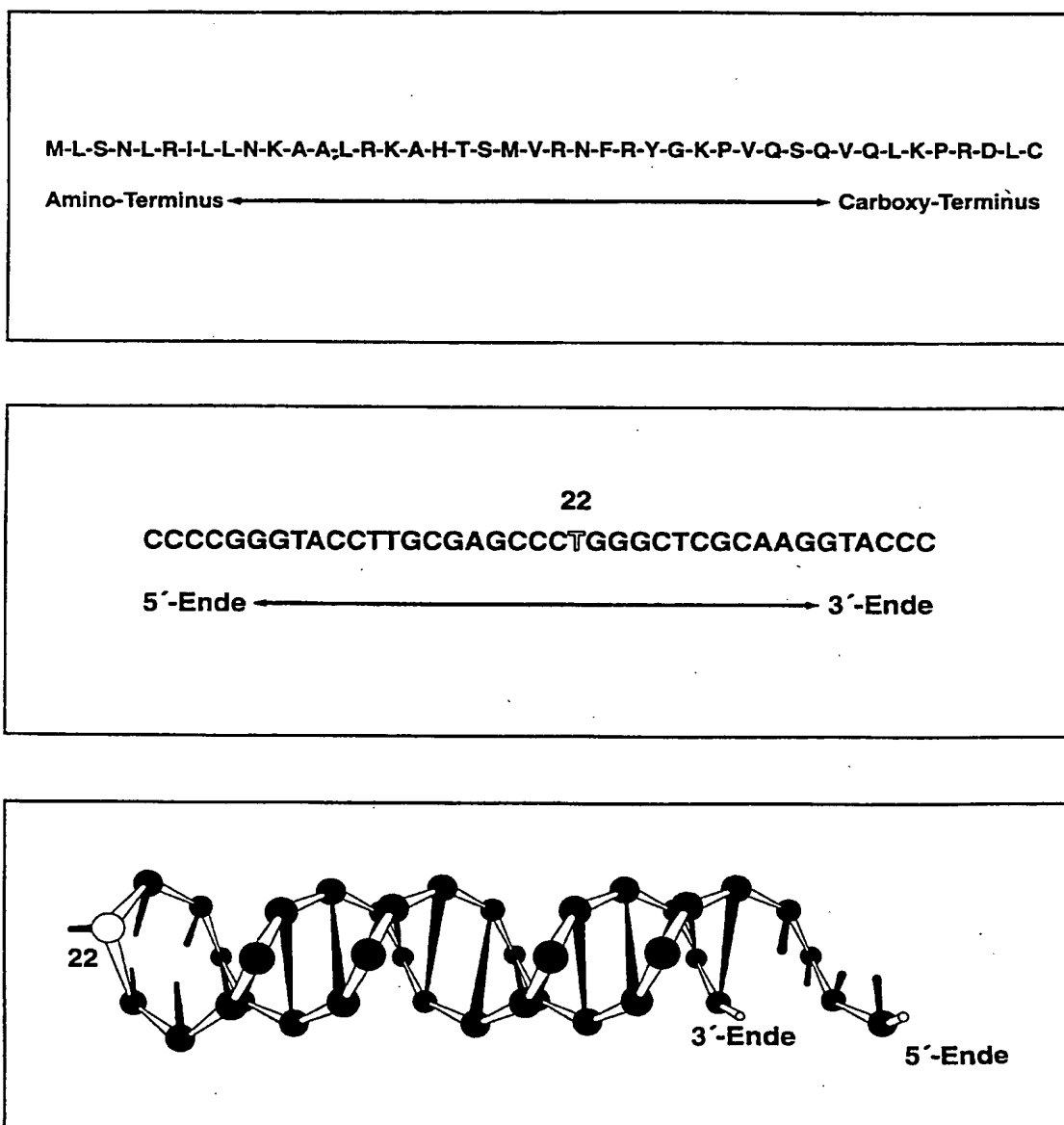
-
- 41) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-40, dadurch gekennzeichnet, daß die multiple Klonierungsstelle Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhaltet, die bevorzugt nicht an einer anderen Stelle des Plasmids vorkommen.
- 5 42) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-41, dadurch gekennzeichnet, daß die multiple Klonierungsstelle in 3'-Richtung zum Promotor und in 5'-Richtung zur Transkriptions-Terminationsstelle angeordnet ist.
- 43) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-42, dadurch gekennzeichnet, daß die multiple Klonierungsstelle in 5'-Richtung zum
10 Selektionsgen angeordnet ist.
- 44) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-43, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Fragment über ligationsfähige (phosphorylierte) Enden verfügt.
- 45) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-44, dadurch
15 gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Fragment über 'blunt-ends' oder 3'-überhängende Enden, bevorzugt 5'-überhängende Enden verfügt.
- 46) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-45, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Fragment über 4 Nukleotide umfassende 5'-Überhänge verfügt, die keine Selbsthomologie (palindromische Sequenz)
20 aufweisen und auch zueinander nicht komplementär sind.
- 47) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-46, dadurch gekennzeichnet, daß die Enden des Nukleinsäure-Fragments über synthetische Oligonukleotide zyklisiert werden.
-

-
- 48) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-47, dadurch gekennzeichnet, daß die überhängenden 5'-Enden der beiden Oligonukleotide jeweils zu einem unterschiedlichen Ende der Nukleinsäure komplementär sind.
- 49) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-48, dadurch
5 gekennzeichnet, daß zwei unterschiedliche 'hairpin-loops' für die Zyklisierung eingesetzt werden, wobei einer spezifisch (komplementär) für das 'linke'-Plasmidende, der andere spezifisch für das 'rechte'-Plasmidende der Nukleinsäure ist.
- 50) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-49, dadurch
10 gekennzeichnet, daß das modifizierte Nukleotid bevorzugt innerhalb des 'loops' lokalisiert ist.
- 51) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 25-50, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmid-DNA mit geeigneten Oligonukleotiden enzymatisch amplifiziert wird, die über mindestens eine Erkennungssequenz für eine
15 Restriktionsendonuklease verfügen, die bevorzugt nicht wiederholt in der Plasmidsequenz auftritt.
- 52) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß die zu verwendende Restriktionsendonuklease überhängende Enden generiert, bevorzugt 5'-überhängende Enden, wobei die Spaltstelle bevorzugt
20 außerhalb der Erkennungssequenz lokalisiert ist.
- 53) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 51 oder 52, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Restriktionsendonuklease um *Bsa* I handelt.
-

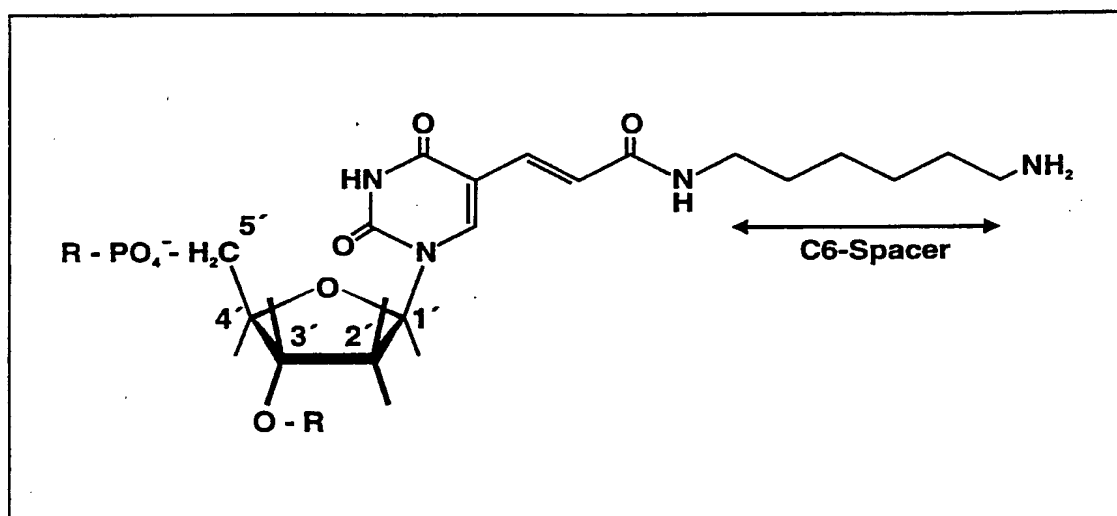
-
- 54) Verfahren zur Herstellung eines chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach einem der Ansprüche 1-53, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- (a) Umsetzung einer Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, mit einem Kopplungsagenz.
 - 5 (b) Umsetzung des Konstruktes aus (a) mit Aminosäuren am Carboxy-terminalen Ende eines Peptids, enthaltend eine Signalsequenz, ausgenommen eine KDEL-Signalsequenz, und
 - (c) wahlweise Verlängerung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments aus (b) um weitere DNA- oder RNA-Fragmente.
- 10 55) Verfahren nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der DNA in Schritt (c) um ein PCR amplifiziertes DNA-Fragment, enthaltend den menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L), sowie das Gen für die mitochondriale transfer RNA Leucin ($tRNA_{Leu}^{(UUR)}$), handelt.
- 15 56) Verfahren zur Herstellung eines chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach einem der Ansprüche 1-53, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- (a) Wahlweise Verlängerung der Nukleinsäure, enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, um weitere DNA- oder RNA-Fragmente.
 - (b) Umsetzung der Nukleinsäure mit funktioneller Kopplungsgruppe oder der verlängerten Nukleinsäure aus (a) mit einem Kopplungsagenz.
 - 20 (c) Umsetzung des Konstruktes aus (b) mit Aminosäuren am Carboxy-terminalen Ende eines Peptids, enthaltend eine Signalsequenz, ausgenommen eine KDEL-Signalsequenz.
- 25 57) Verfahren nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der DNA in Schritt (a) um ein PCR amplifiziertes DNA-Fragment, enthaltend den menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L), sowie das Gen für die mitochondriale transfer RNA Leucin ($tRNA_{Leu}^{(UUR)}$), handelt.
-

- 58) Verwendung der chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmente nach einem der Ansprüche 1-53 zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen, gekennzeichnet durch die Umsetzung des Fragmentes mit Zellen oder vorbehandelten Zellkompartimenten.
- 5 59) Verwendung nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet daß es sich bei den vorbehandelten Zellkompartimenten um energetisierte Mitochondrien handelt.
- 60) Verwendung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach einem der Ansprüche 1-59 zur Einbringung in eukaryotische Zellen.
- 10 61) Verwendung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, daß das 'Particle Gun' System, Elektroporation, Mikroinjektion oder Lipotransfektion zur Einbringung in eukaryotische Zellen angewendet wird.
-

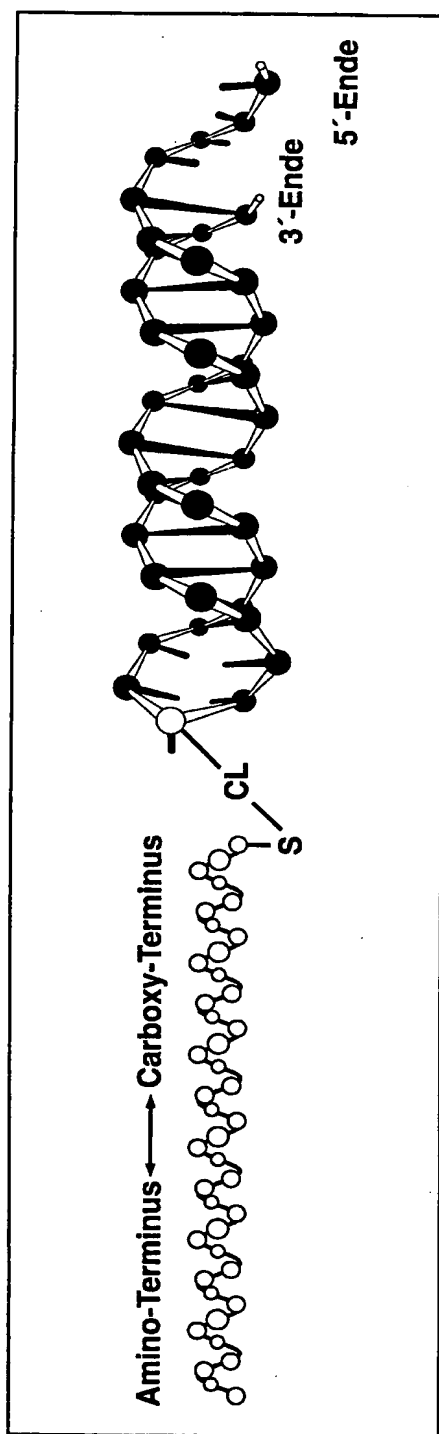
Figur 1



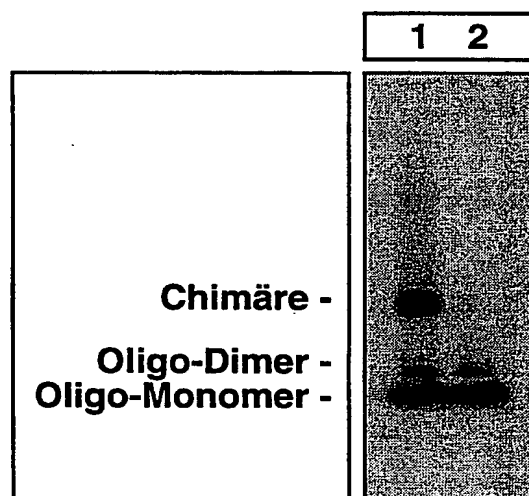
Figur 2



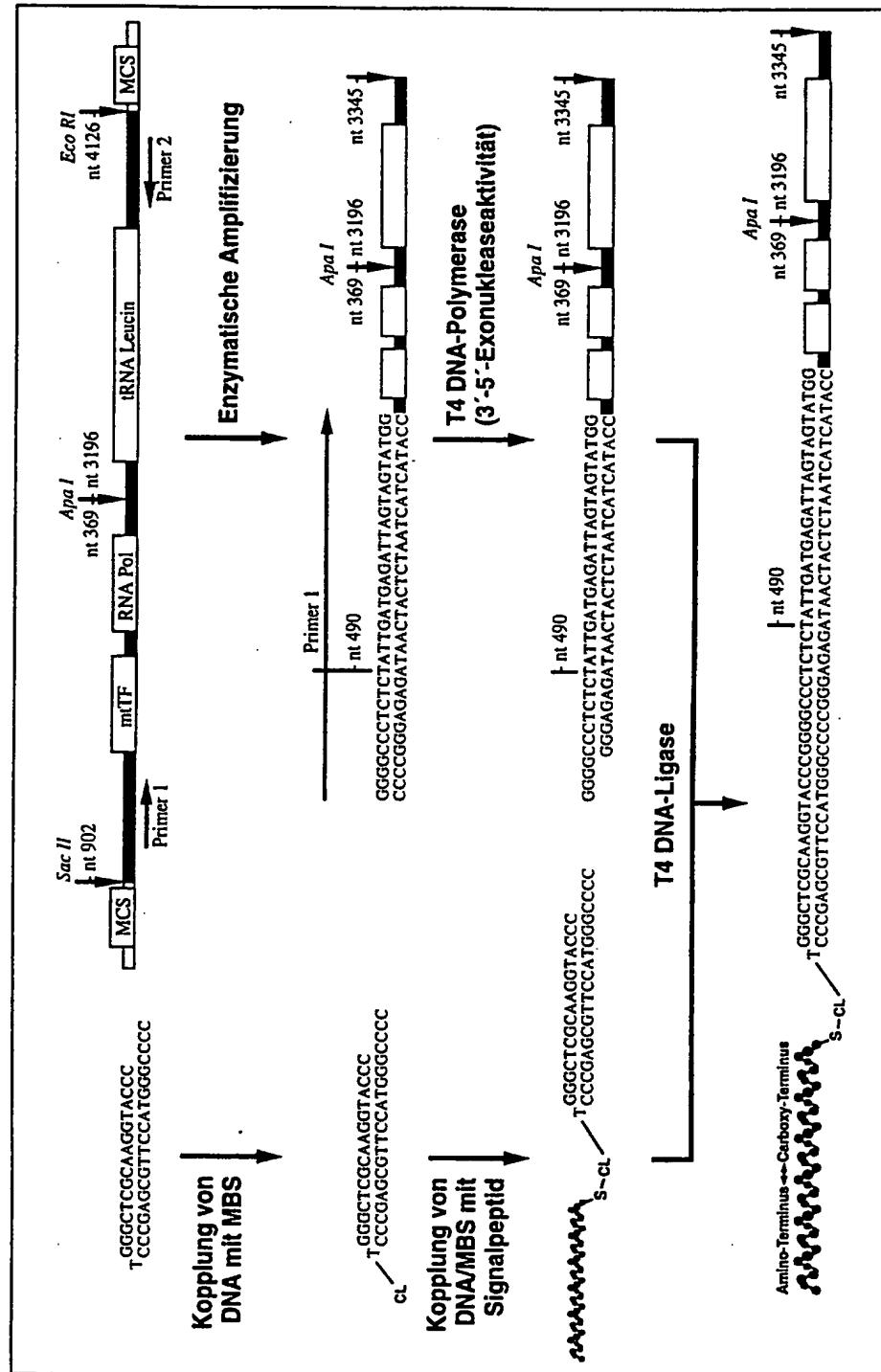
Figur 3



Figur 4



Figur 5a

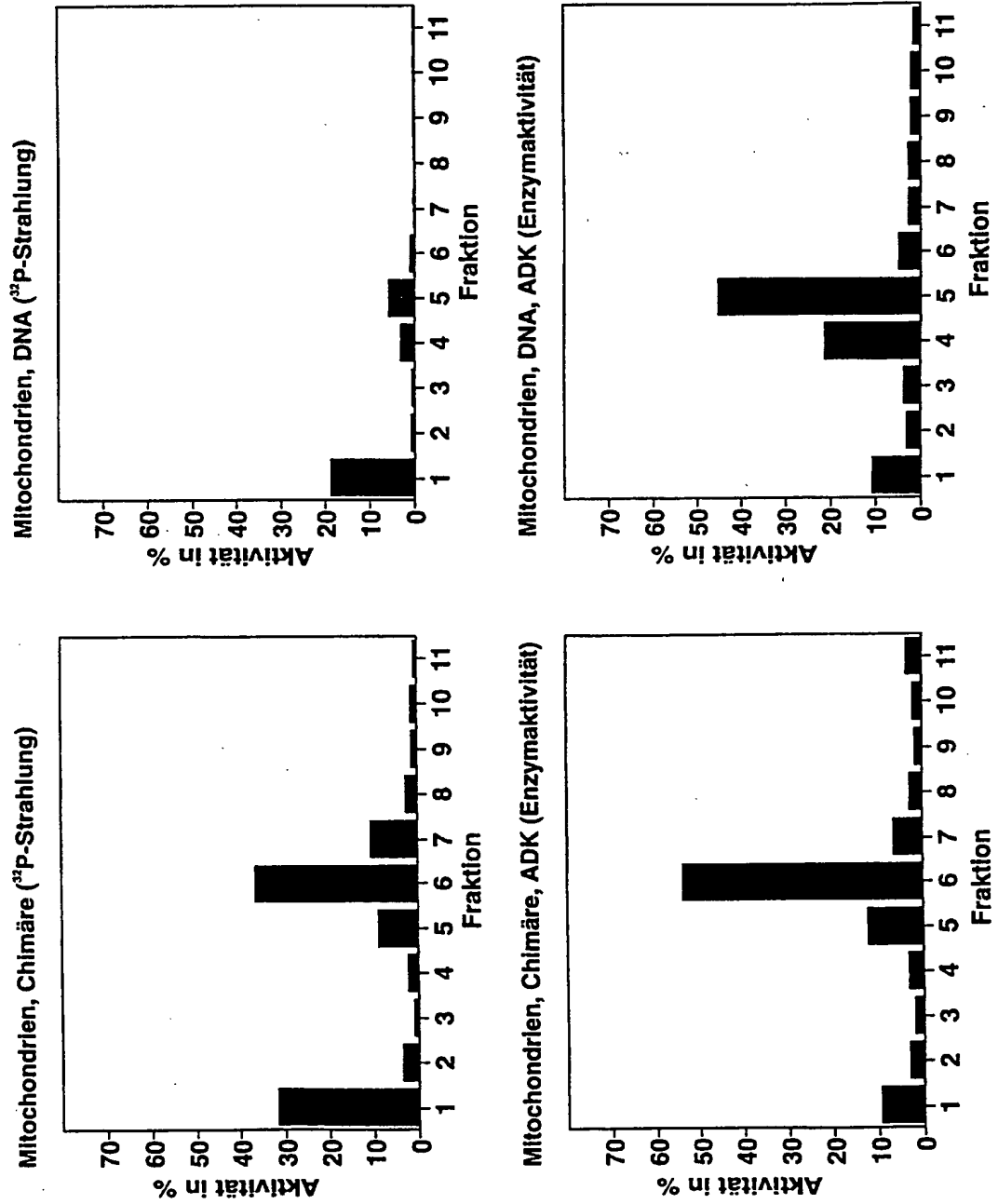


Figur 5b

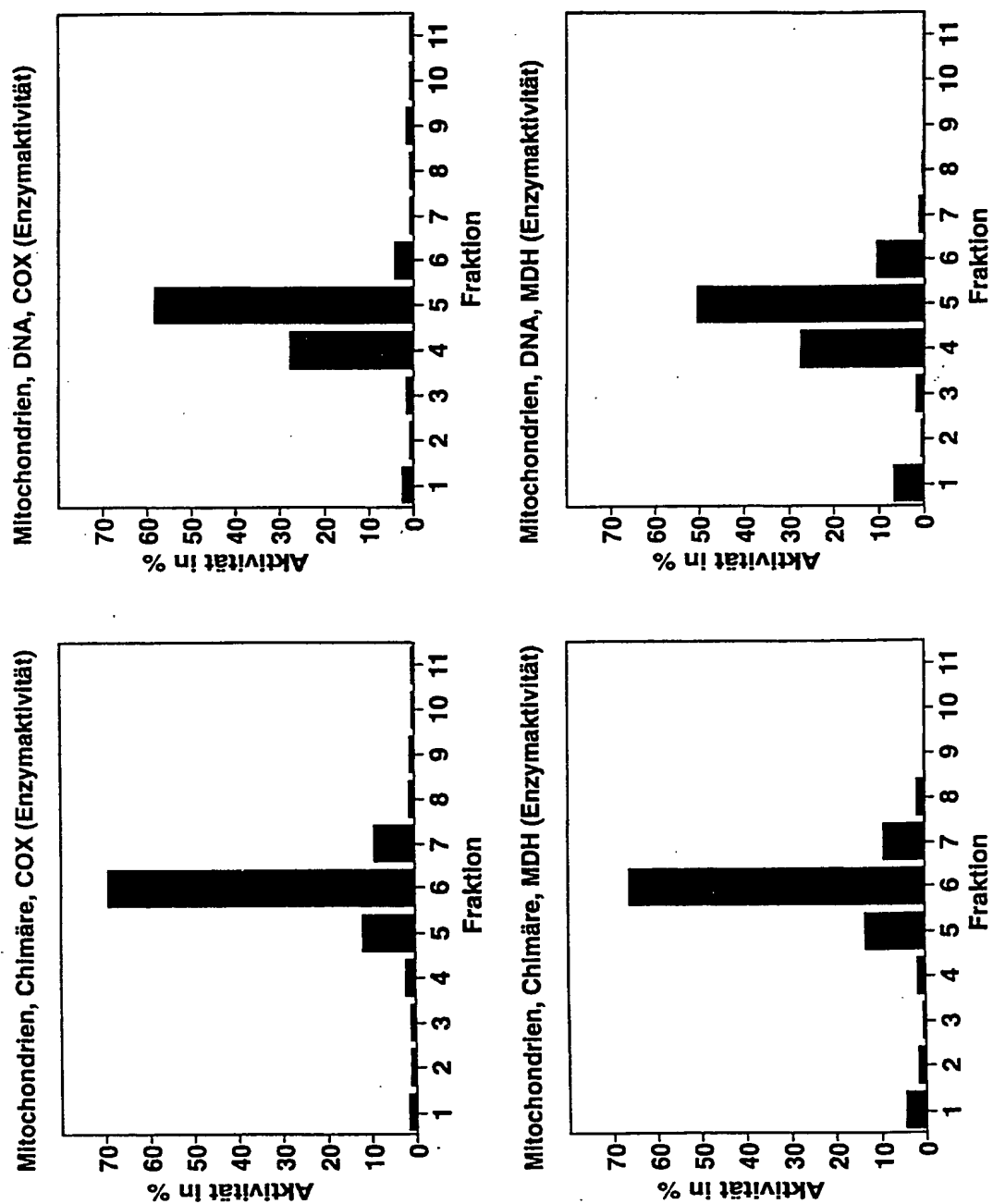
10	20	30	40	50	60
CCGCGGTGGC	TGGCACGAAA	TTGACCAACC	CTGGGGTGTAG	TATAGCTTAG	TTAAACTTTC
GGCGCCACCG	ACCGTGCTTT	AACTGGTTGG	GACCCCAATC	ATATCGAATC	AATTTGAAAG
70	80	90	100	110	120
GTTTATTGCT	AAAGGTTAAT	CACTGCTGTT	TCCCGTGGGG	GTGTGGCTAG	GCTAAGCGTT
CAAATAACGA	TTTCCAATTA	GTGACGACAA	AGGGCACCCC	CACACCGATC	CGATTTCGCA
130	140	150	160	170	180
TTGAGCTGCA	TTGCTGCGTG	CTTGATGCTT	GTTCCTTTTG	ATCGTGGTGA	TTTAGAGGGT
AACTCGACGT	AACGACGCAC	GAACACGAA	CAAGGAAAAC	TAGCACCCT	AAATCTCCCA
190	200	210	220	230	240
GAACCTCACTG	GAACGGGGAT	GCTTGCATGT	GTAATCTTAC	TAAGAGCTAA	TAGAAAAGGCT
CTTGAGTGAC	CTTGCCCCCTA	CGAACGTACA	CATTAGAATG	ATTCTCGATT	ATCTTTCCGA
250	260	270	280	290	300
AGGACCAAAC	CTATTTGTTT	ATGGGGTGAT	GTGAGCCCGT	CTAAACATTT	TCAGTGTATT
TCTTCTTTTG	GATAAACAAA	TACCCCACTA	CACTCGGGCA	GATTTGTAAA	AGTCACATAA
310	320	330	340	350	360
GCTTCTGGA	GGTAAGCTAC	ATAAACTGTG	GGGGGTGTCT	TTGGGGTTTG	GTTGGTTCGG
CGAATCTCT	CCATTTCGATG	TATTTGACAC	CCCCCACAGA	AACCCCAAAC	CAACCAAGCC
370	380	390	400	410	420
GGTATCTCT	TAGCAGCGGT	GTGTGTGTGC	TGGGTAGGAT	GGGCGGGGGT	TGTATTGATG
CCATACCTCA	ATCGTCGCCA	CACACACACG	ACCCATCCTA	CCCGCCCCCA	ACATAACTAC
430	440	450	460	470	480
AGATTAGTAG	TATGGGAGTG	GGAGGGGAAA	ATAATGTGTT	AGTTGGGGGG	TGACTGTAA
TCTAATCATC	ATACCCTCAC	CCTCCCCTTT	TATTACACAA	TCAACCCCCC	ACTGACAATT
490	500	510	520	530	540
AAGTGCATAC	CGCCAAAAGA	TAAAATTTGA	AATCTGGTTA	GGCTGGTGTG	AGGGCCCTTT
TTCACGTATG	GCGGTTTTCT	ATTTTAAACT	TTAGACCAAT	CCGACCACAA	TCCCGGGAAA
550	560	570	580	590	600
GTCCACACACC	CACCCAAGAA	CAGGGTTTGT	TAAGATGGCA	GAGCCCGGTA	ATCGCATAAA
CAGGGTGTGG	GTGGGTCTT	GTCCCAAACA	ATTCTACCGT	CTCGGGCCAT	TAGCGTATTT
610	620	630	640	650	660
ACTTAAACT	TTACAGTCAG	AGGTTCAATT	CCTCTTCTTA	ACAACATACC	CATGGCCAAC
TGAATTTTGA	AATGTCAGTC	TCCAAGTTAA	GGAGAAGAAT	TGTTGTATGG	GTACCGGTTG
670	680	690	700	710	720
CTCCTACTCC	TCATTGTACC	CATTCTAATC	GCAATGGCAT	TCCTAATGCT	TACCGAACGA
GAGGATGAGG	AGTAACATGG	GTAAGATTAG	CGTTACCGTA	AGGATTACGA	ATGGCTTGCT
730	740	750	760	770	780
AAAATTCTAG	GCTATATACA	ACTACGCAAA	GGCCCCAACG	TGGTAGGCCC	CTACGGGGCTA
TTTTAAGATC	CGATATATGT	TGATGCGTTT	CCGGGGTTGC	ACCATCCGGG	GATGCCCGAT

790	800	810	820	830	840
CTACAACCT	TCGCTGACGC	CATAAACTC	TTCACCAAAG	AGCCCCTAAA	ACCCGCCACA
GATGTTGGGA	AGCGACTGCG	GTATTTTGAG	AAGTGGTTTC	TCGGGGATTT	TGGGCGGTGT
850	860	870	880	890	900
TCTACCATCA	CCCTCTACAT	CACCGCCCCG	ACCTTAGCTC	TCACCATCGC	TCTTCTACTA
AGATGGTAGT	GGGAGATGTA	GTGGCGGGGC	TGGAATCGAG	AGTGGTAGCG	AGAAGATGAT
910	920	930	940	950	960
TGAACCCCCC	TCCCCATACC	CAACCCCTCG	GTCAACCTCA	ACCTAGGCCT	CCTATTTATT
ACTTGGGGGG	AGGGGTATGG	GTTGGGGGAC	CAGTTGGAGT	TGGATCCGGA	GGATAAATAA
970	980	990	1000	1010	1020
CTAGCCACCT	CTAGCCTAGC	CGTTTACTCA	ATCCTCTGAT	CAGGGTGAGC	ATCAAACCTCA
GATCGGTGGA	GATCGGATCG	GCAAATGAGT	TAGGAGACTA	GTCCCACTCG	TAGTTTGAGT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AACTACGCCC	TGATCGGCGC	ACTGCGAGCA	GTAGCCCAAA	CAATCTCATA	TGAAGTCACC
TTGATGCGGG	ACTAGCCGCG	TGACGCTCGT	CATCGGGTTT	GTTAGAGTAT	ACTTCAGTGG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CTAGCCATCA	TTCTACTATC	AACATTACTA	ATAAGTGGCT	CCTTTAACCT	CTCCACCCTT
GATCGGTAGT	AAGATGATAG	TTGTAATGAT	TATTCACCGA	GGAAATTGGA	GAGGTGGGAA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ATCACAACAC	AAGAACACCT	CTGATTACTC	CTGCCATCAT	GACCCTTGGC	CATAATATGA
TAGTGTTGTG	TTCTTGTGGA	GACTAATGAG	GACGGTAGTA	CTGGGAACCG	GTATTATACT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TTTATCTCCA	CACTAGCAGA	GACCAACCGA	ACCCCTTCG	ACCTTGCCGA	AGGGGAGTCC
AAATAGAGGT	GTGATCGTCT	CTGGTTGGCT	TGGGGGAAGC	TGGAACGGCT	TCCCCTCAGG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAACTAGTCT	CAGGCTTCAA	CATCGAATAC	GCCGCAGGCC	CCTTCGCCCT	ATTCTTCATA
CTTGATCAGA	GTCCGAAGTT	GTAGCTTATG	CGGCGTCCGG	GGAAGCGGGA	TAAGAAGTAT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GCCGAATACA	CAAACATTAT	TATAATAAAC	ACCCTCACCA	CTACAATCTT	CCTAGGAACA
CGGCTTATGT	GTTTGTAAATA	ATATTATTTG	TGGGAGTGGT	GATGTTAGAA	GGATCCTTGT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ACATATGACG	CACTCTCCCC	TGAACTCTAC	ACAACATATT	TTGTCACCAA	GACCCTACTT
TGTATACTGC	GTGAGAGGGG	ACTTGAGATG	TGTTGTATAA	AACAGTGgTT	CTGGGATGAA
1450	1460				
CTAACCTCCC	TGTTCTTATG	AATTC			
GATTGGAGGG	ACAAGAATAC	TTAAG			

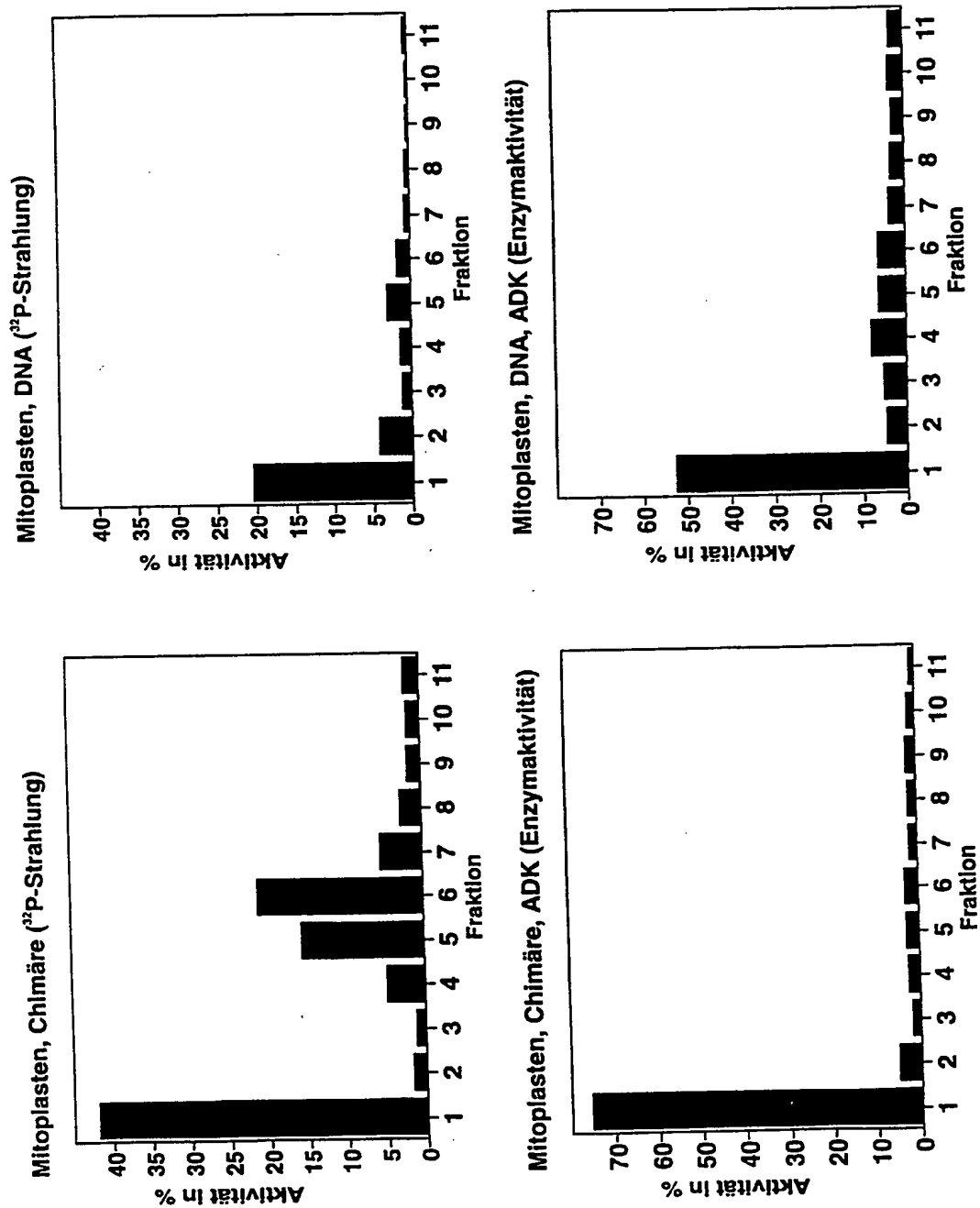
Figur 6a



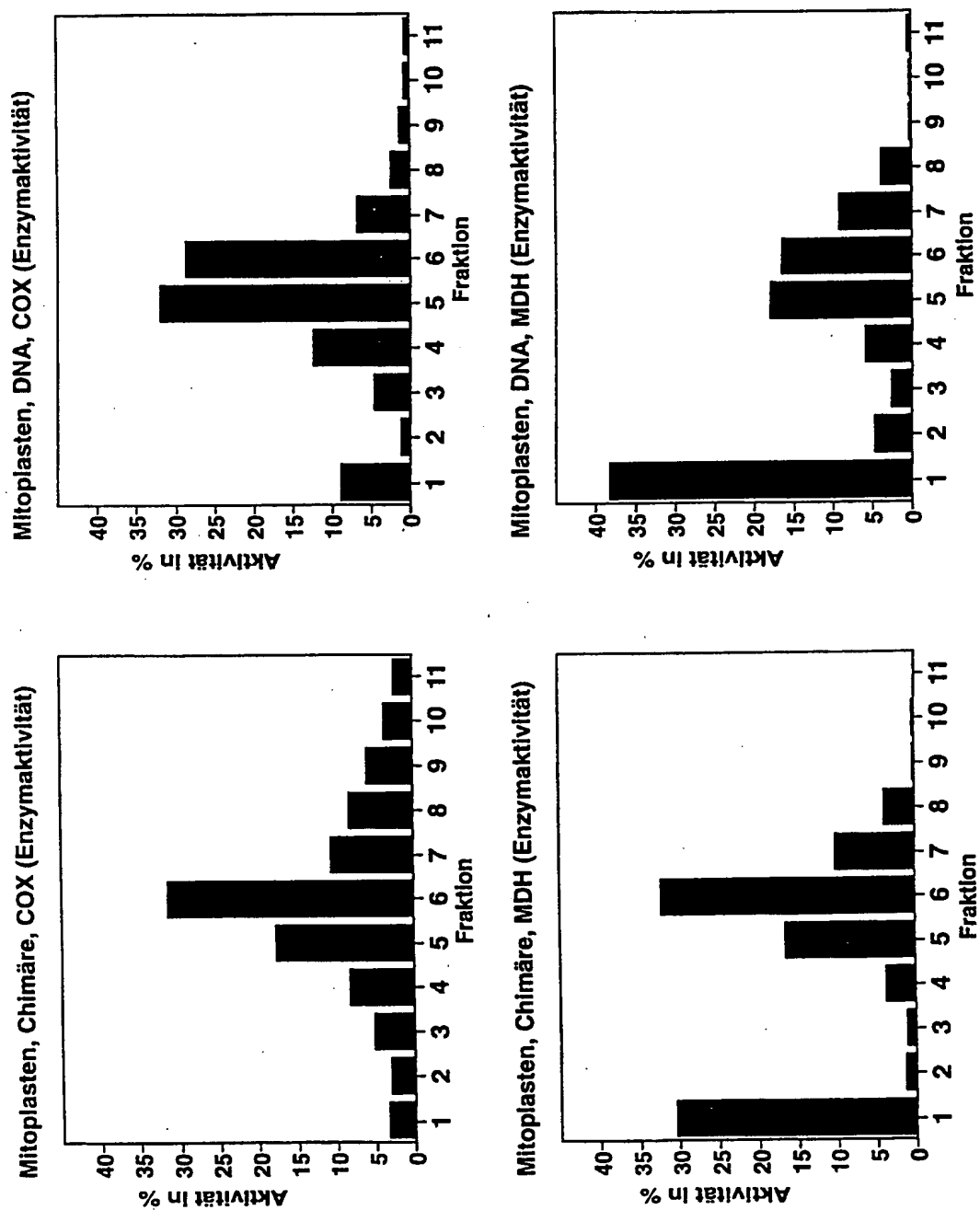
Figur 6b



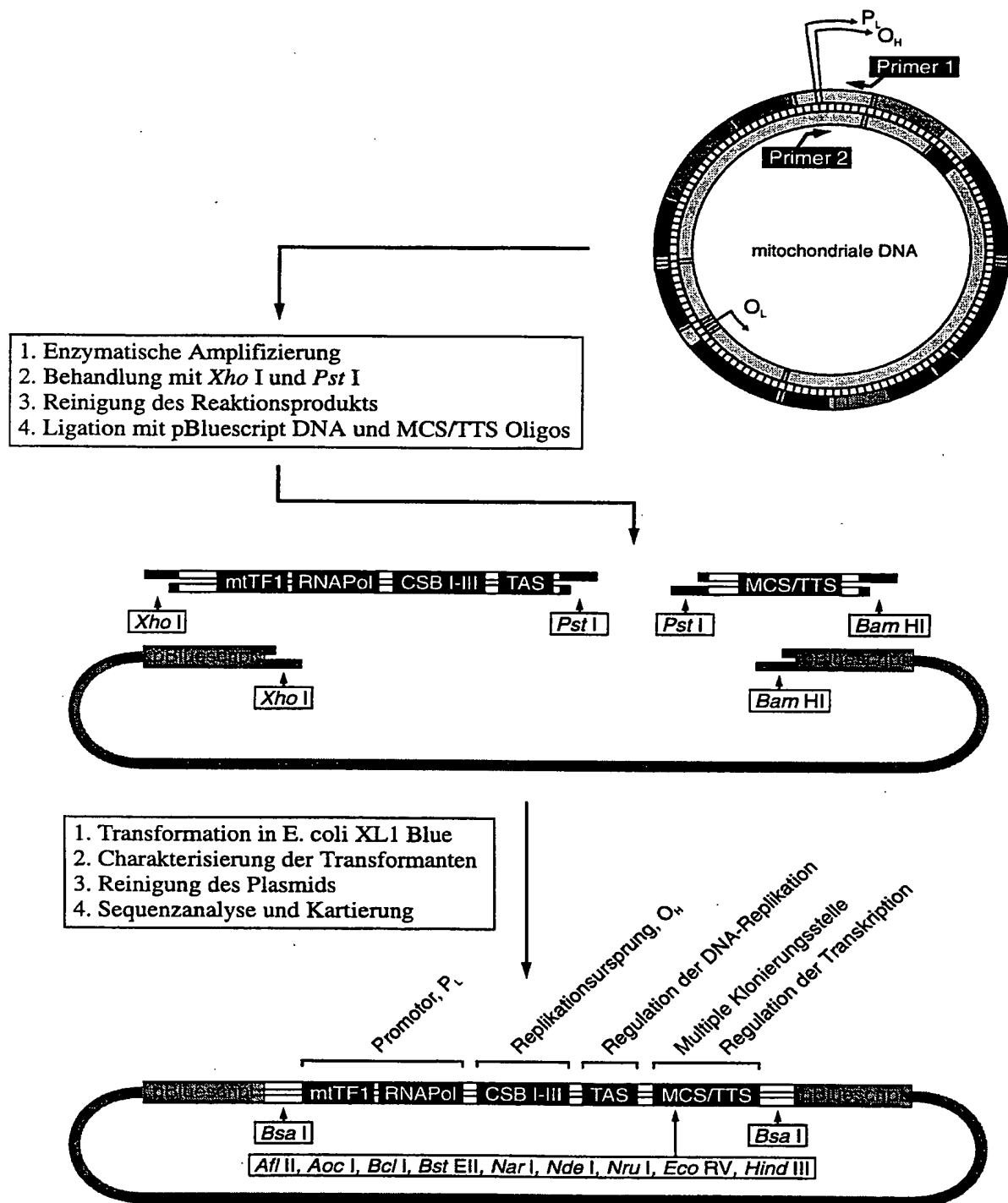
Figur 7a



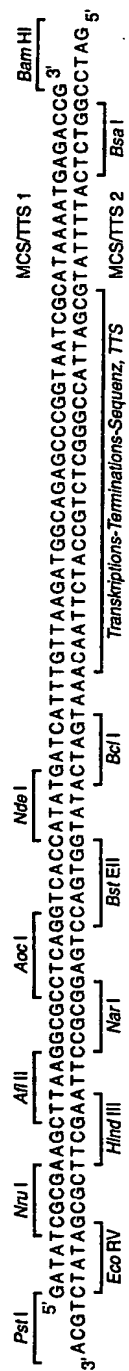
Figur 7b



Figur 8



Figur 9

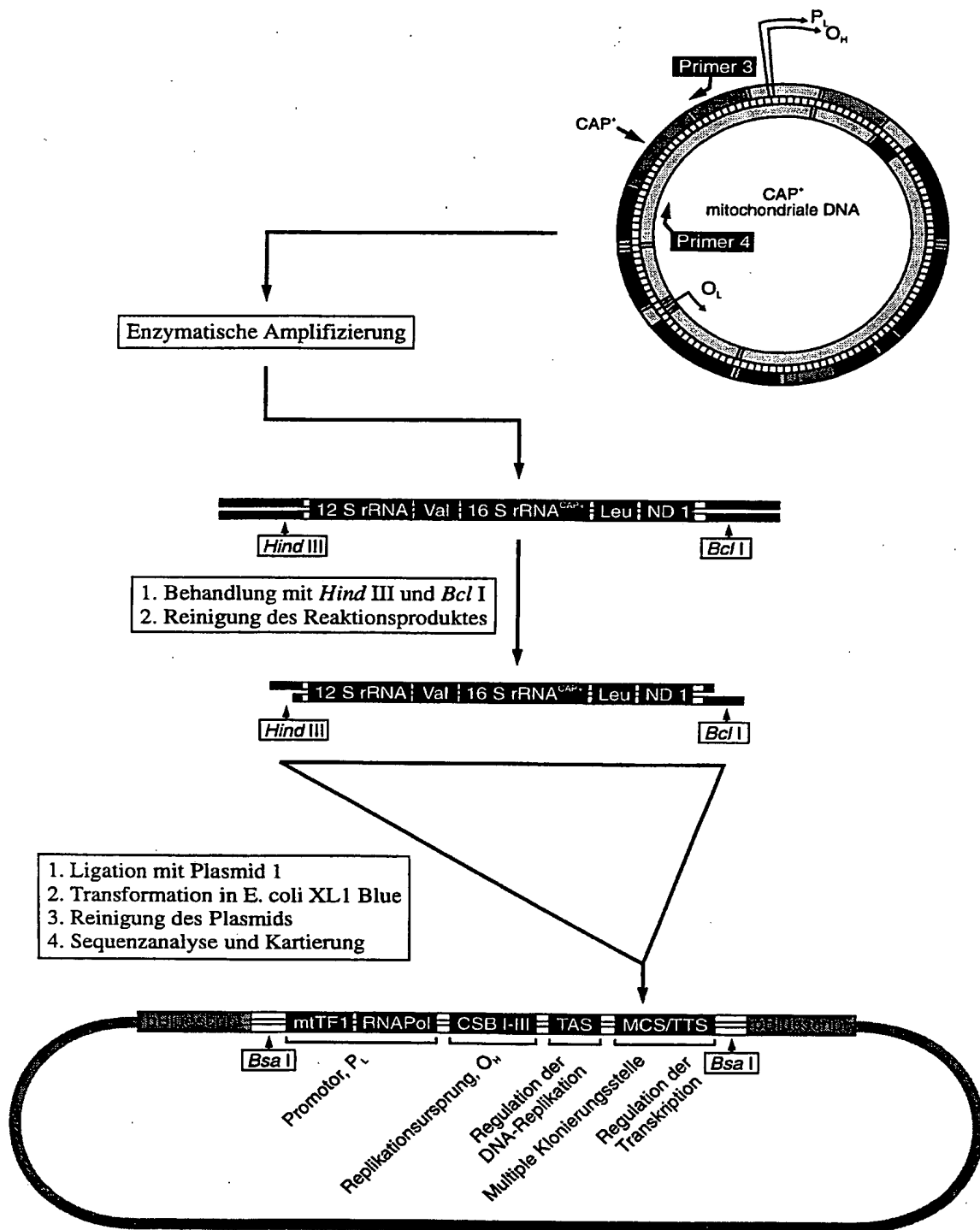


Figur 10

10	20	30	40	50	60
CTCGAGGGTC	TCAGGGGCTA	ATAGAAAGGC	TAGGACCAAA	CCTATTTGTT	TATGGGGTGA
GAGCTCCCAG	AGTCCCCGAT	TATCTTTCCG	ATCCTGGTTT	GGATAAACAA	ATACCCCCT
70	80	90	100	110	120
TGTGAGCCCG	TCTAAACATT	TTCAGTGTAT	TGCTTTGAGG	AGGTAAGCTA	CATAAACTGT
ACACTCGGGC	AGATTTGTAA	AAGTCACATA	ACGAAACTCC	TCCATTTCGAT	GTATTTGACA
130	140	150	160	170	180
GGGGGGTGTG	TTTGGGGTTT	GGTTGGTTTC	GGGTATGGGG	TTAGCAGCGG	TGTGTGTGTG
CCCCCACAG	AAACCCCAAA	CCAACCAAGC	CCCATACCCC	AATCGTCGCC	ACACACACAC
190	200	210	220	230	240
CTGGGTAGGA	TGGGCGGGGG	TTGTATTGAT	GAGATTAGTA	GTATGGGAGT	GGGAGGGGAA
GACCCATCCT	ACCCGCCCCC	AACATAACTA	CTCTAATCAT	CATACCCTCA	CCCTCCCCTT
250	260	270	280	290	300
AATAATGTGT	TAGTTGGGGG	GTGACTGTTA	AAAGTGCATA	CCGCCAAAAG	ATAAAATTTG
TTATTACACA	ATCAACCCCC	CACTGACAAT	TTTCACGTAT	GGCGGTTTTT	TATTTTAAAC
310	320	330	340	350	360
AAATCTGGTT	AGGCTGGTGT	TAGGGTCTTT	TGTTTTTGGG	GTTTGGCAGA	GATGTGTTTA
TTTAGACCAA	TCCGACCACA	ATCCCAAGAA	ACAAAAACCC	CAAACCGTCT	CTACACAAAT
370	380	390	400	410	420
AGTGCTGTGG	CCAGAAGCGG	GGGAGGGGGG	GTTTGGTGGA	AATTTTTTGT	TATGATGTCT
TCACGACACC	GGTCTTCGCC	CCCTCCCCCC	CAAACCACCT	TTAAAAAACA	ATACTACAGA
430	440	450	460	470	480
GTGTGGAAG	TGGCTGTGCA	GACATTCAAT	TGTTATTATT	ATGTCCTACA	AGCATTAATT
CACACCTTTC	ACCGACACGT	CTGTAAGTTA	ACAATAATAA	TACAGGATGT	TCGTAATTAA
490	500	510	520	530	540
AATTAACACA	CTTTAGTAAG	TATGTTTCGCC	TGTAATATTG	AACGTAGGTG	CGATAAATAA
TTAATTGTGT	GAAATCATTC	ATACAAGCGG	ACATTATAAC	TTGCATCCAC	GCTATTTATT
550	560	570	580	590	600
TAGGATGAGG	CAGGAATCAA	AGACAGATAC	TGCGACATAG	GGTGCTCCGG	CTCCAGCGTC
ATCCTACTCC	GTCTTAGTTC	TCTGTCTATG	ACGCTGTATC	CCACGAGGCC	GAGGTCGCAG
610	620	630	640	650	660
TCGCAATGCT	ATCGCGTGCA	TACCCCCCAG	ACGAAAATAC	CAAATGCATG	GAGAGCTCCC
AGCGTTACGA	TAGCGCACGT	ATGGGGGGTC	TGCTTTTATG	GTTTACGTAC	CTCTCGAGGG
670	680	690	700	710	720
GTGAGTGGTT	AATAGGGTGA	TAGACCTGTG	ATCCATCGTG	ATGTCTTATT	TAAGGGGAAC
CACTCACCAA	TTATCCCCT	ATCTGGACAC	TAGGTAGCAC	TACAGAATAA	ATTCCCCCTG
730	740	750	760	770	780
GTGTGGGCTA	TTTAGGCTTT	ATGACCCTGA	AGTAGGAACC	AGATGTCGGA	TACAGTTCAC
CACACCCGAT	AAATCCGAAA	TACTGGGACT	TCATCCTTGG	TCTACAGCCT	ATGTCGAAGTG
790	800	810	820	830	840
TTTAGCTACC	CCCAAGTGTT	ATGGGCCCCG	AGCGAGGAGA	GTAGCACTCT	TGTGCGGGAT
AAATCGATGG	GGGTTCACAA	TACCCGGGCC	TCGCTCCTCT	CATCGTGAGA	ACACGCCCTA

850	860	870	880	890	900
ATTGATTTCA	CGGAGGATGG	TGGTCAAGGG	ACCCCTATCT	GAGGGGGGTC	ATCCATGGGG
TAACTAAAGT	GCCTCCTACC	ACCAGTTCCC	TGGGGATAGA	CTCCCCCAG	TAGGTACCCC
910	920	930	940	950	960
ACGAGAAGGG	ATTTGACTGT	AATGTGCTAT	GTACGGTAAA	TGGCTTTATG	TACTATGTAC
TGCTCTTCCC	TAAACTGACA	TTACACGATA	CATGCCATTT	ACCGAAATAC	ATGATACATG
970	980	990	1000	1010	1020
TGTTAAGGGT	GGGTAGGTTT	GTTGGTATCC	TAGTGGGTGA	GGGGTGGCTT	TGGAGTTGCA
ACAATTCCCA	CCCATCCAAA	CAACCATAGG	ATCACCCACT	CCCCACCGAA	ACCTCAACGT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTTGATGTGT	GATAGTTGAG	GGTTGATTGC	TGTACTTGCT	TGTAAGCATG	GGGAGGGGGT
CAACTACACA	CTATCAACTC	CCAACCTAAG	ACATGAACGA	ACATTCTGAC	CCCTCCCCCA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTTGATGTGG	ATTGGGTTTT	TATGTACTAC	AGGTGGTCAA	GTATTTATGG	TACCGTACAA
AAACTACACC	TAACCCAAAA	ATACATGATG	TCCACCAGTT	CATAAATACC	ATGGCATGTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TATTCATGGT	GGCTGGCAGT	AATGTACGAA	ATACATAGCG	GTTGTTGATG	GGTGAGTCAA
ATAAGTACCA	CCGACCGTCA	TTACATGCTT	TATGTATCGC	CAACAACCTAC	CCACTCAGTT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TACTTGGGTG	GTACCCAAAT	CTGCTTCCCC	ATGAAAGAAC	AGAGAATAGT	TTAAATTAGA
ATGAACCCAC	CATGGGTTTA	GACGAAGGGG	TACTTTCTTG	TCTCTTATCA	AATTTAATCT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ATCTTAGCTT	TGGGTGCTAA	TGGTGGAGTT	AAAGACTTTT	TCTCTGATTT	GTCCTTGGA
TAGAATCGAA	ACCCACGATT	ACCACCTCAA	TTTCTGAAAA	AGAGACTAAA	CAGGAACCTT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AAAGGTTTTT	ATCTCCGGTT	TACAAGACTG	GTGTATTAGC	TGCAGATATC	GCGAAGCTTA
TTTCCAAAAG	TAGAGGCCAA	ATGTTCTGAC	CACATAATCG	ACGTCTATAG	CGCTTCGAAT
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AGGCGCCTCA	GGTCACCATA	TGATCATTTG	TTAAGATGGC	AGAGCCCGGT	AATCGCATAA
TCCGCGGAGT	CCAGTGGTAT	ACTAGTAAAC	AATTCTACCG	TCTCGGGCCA	TTAGCGTATT
1450					
AATGAGACCG	GATCC				
TTACTCTGGC	CTAGG				

Figur 11



Figur 12

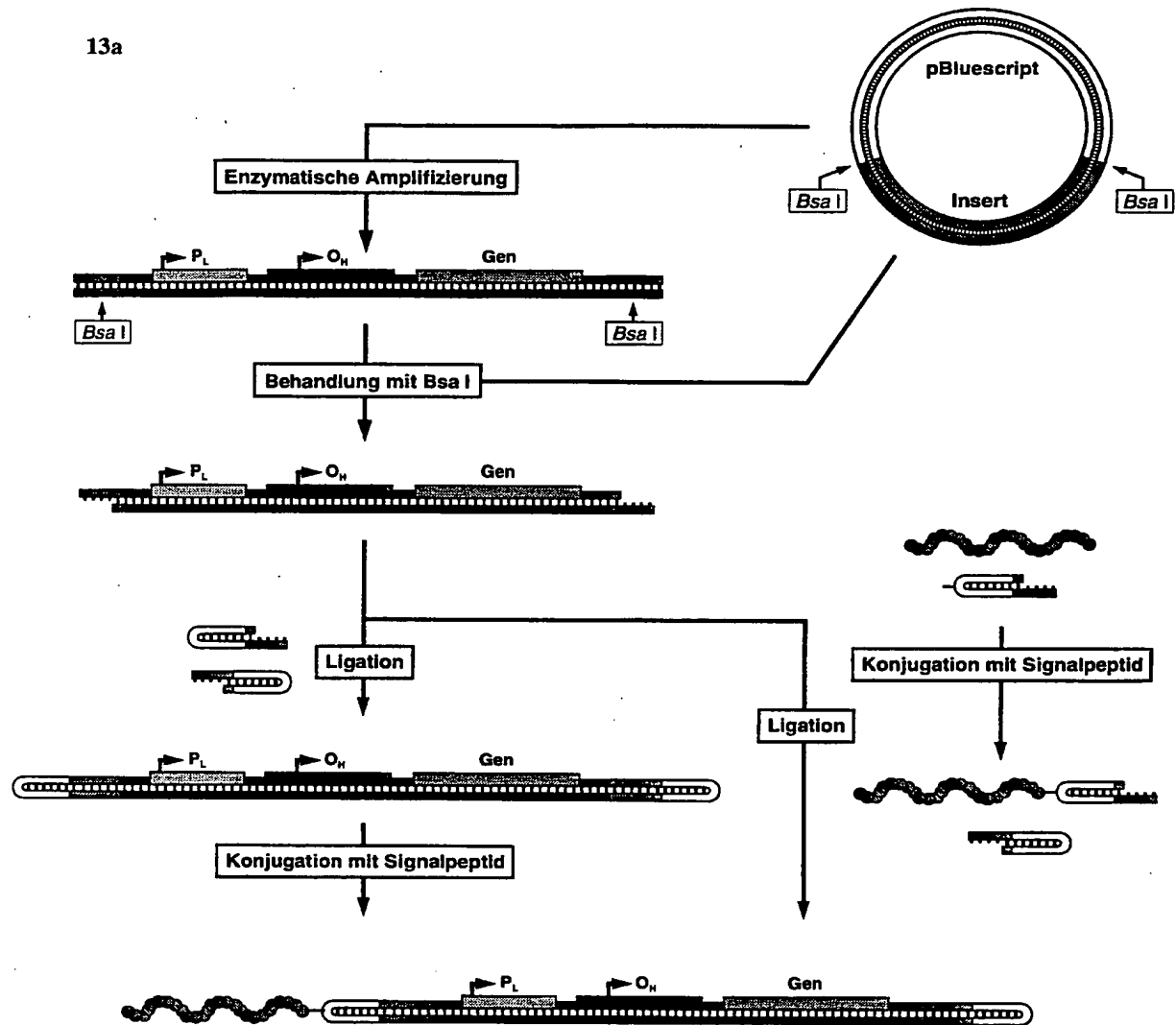
10	20	30	40	50	60
CTCGAGGGTC	TCAGGGGCTA	ATAGAAAGGC	TAGGACCAAA	CCTATTTGTT	TATGGGGTGA
GAGCTCCAG	AGTCCCCGAT	TATCTTTCCG	ATCCTGGTTT	GGATAAACAA	ATACCCCCT
70	80	90	100	110	120
TGTGAGCCCG	TCTAAACATT	TTCAGTGTAT	TGCTTTGAGG	AGGTAAGCTA	CATAAACTGT
ACACTCGGGC	AGATTTGTAA	AAGTCACATA	ACGAAACTCC	TCCATTGAT	GTATTTGACA
130	140	150	160	170	180
GGGGGGTGTG	TTTGGGGTTT	GGTTGGTTTCG	GGGTATGGGG	TTAGCAGCGG	TGTGTGTGTG
CCCCCACAG	AAACCCCAAA	CCAACCAAGC	CCCATACCCC	AATCGTCGCC	ACACACACAC
190	200	210	220	230	240
CTGGGTAGGA	TGGGCGGGGG	TTGTATTGAT	GAGATTAGTA	GTATGGGAGT	GGGAGGGGAA
GACCCATCCT	ACCCGCCCCC	AACATAACTA	CTCTAATCAT	CATACCCTCA	CCCTCCCCTT
250	260	270	280	290	300
AATAATGTGT	TAGTTGGGGG	GTGACTGTTA	AAAGTGCATA	CCGCCAAAAG	ATAAAATTTG
TTATTACACA	ATCAACCCCC	CACTGACAAT	TTTCACGTAT	GGCGGTTTTT	TATTTTAAAC
310	320	330	340	350	360
AAATCTGGTT	AGGCTGGTGT	TAGGGTTCTT	TGTTTTTGGG	GTTTGGCAGA	GATGTGTTTA
TTTAGACCAA	TCCGACCACA	ATCCCAAGAA	ACAAAAACCC	CAAACCGTCT	CTACACAAAT
370	380	390	400	410	420
AGTGCTGTGG	CCAGAAGCGG	GGGAGGGGGG	GTTTGGTGGA	AATTTTTTGT	TATGATGTCT
TCACGACACC	GGTCTTCGCC	CCCTCCCCC	CAAACCACCT	TTAAAAAACA	ATACTACAGA
430	440	450	460	470	480
GTGTGGAAAG	TGGCTGTGCA	GACATTCAAT	TGTTATTATT	ATGTCCTACA	AGCATTAATT
CACACCTTTC	ACCGACACGT	CTGTAAGTTA	ACAATAATAA	TACAGGATGT	TCGTAATTAA
490	500	510	520	530	540
AATTAACACA	CTTTAGTAAG	TATGTTTCGCC	TGTAATATTG	AACGTAGGTG	CGATAAATAA
TTAATTGTGT	GAAATCATTC	ATACAAGCGG	ACATTATAAC	TTGCATCCAC	GCTATTTATT
550	560	570	580	590	600
TAGGATGAGG	CAGGAATCAA	AGACAGATAC	TGCGACATAG	GGTGCTCCGG	CTCCAGCGTC
ATCCTACTCC	GTCCTTAGTT	TCTGTCTATG	ACGCTGTATC	CCACGAGGCC	GAGGTGCGAG
610	620	630	640	650	660
TCGCAATGCT	ATCGCGTGCA	TACCCCCCAG	ACGAAAATAC	CAAATGCATG	GAGAGCTCCC
AGCGTTACGA	TAGCGCACGT	ATGGGGGGTC	TGCTTTTATG	GTTTACGTAC	CTCTCGAGGG
670	680	690	700	710	720
GTGAGTGGTT	AATAGGGTGA	TAGACCTGTG	ATCCATCGTG	ATGTCTTATT	TAAGGGGAAC
CACTCACCAA	TTATCCCACT	ATCTGGACAC	TAGGTAGCAC	TACAGAATAA	ATTCCCCTTG
730	740	750	760	770	780
GTGTGGGCTA	TTTAGGCTTT	ATGACCCTGA	AGTAGGAACC	AGATGTGCGA	TACAGTTTAC
CACACCCGAT	AAATCCGAAA	TACTGGGACT	TCATCCTTGG	TCTACAGCCT	ATGTCAAGTG
790	800	810	820	830	840
TTTAGCTACC	CCCAAGTGT	ATGGGCCCCG	AGCGAGGAGA	GTAGCACTCT	TGTGCGGGAT
AAATCGATGG	GGGTTTCAAA	TACCCGGGCC	TCGCTCCTCT	CATCGTGAGA	ACACGCCCTA

850	860	870	880	890	900
ATTGATTTC	CGGAGGATGG	TGGTCAAGGG	ACCCCTATCT	GAGGGGGGTC	ATCCATGGGG
TAACTAAAGT	GCCTCCTACC	ACCAGTTCCC	TGGGGATAGA	CTCCCCCAG	TAGGTACCCC
910	920	930	940	950	960
ACGAGAAGGG	ATTTGACTGT	AATGTGCTAT	GTACGGTAAA	TGGCTTTATG	TACTATGTAC
TGCTCTTCCC	TAAACTGACA	TTACACGATA	CATGCCATTT	ACCGAAATAC	ATGATACATG
970	980	990	1000	1010	1020
TGTTAAGGGT	GGGTAGGTTT	GTTGGTATCC	TAGTGGGTGA	GGGGTGGCTT	TGGAGTTGCA
ACAATTCCCA	CCCATCCAAA	CAACCATAGG	ATCACCCACT	CCCCACCGAA	ACCTCAACGT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GTTGATGTGT	GATAGTTGAG	GGTTGATTGC	TGTACTTGCT	TGTAAGCATG	GGGAGGGGGT
CAACTACACA	CTATCAACTC	CCAACTAACG	ACATGAACGA	ACATTCTGTAC	CCCTCCCCCA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTTGATGTGG	ATTGGGTTTT	TATGTACTAC	AGGTGGTCAA	GTATTTATGG	TACCGTACAA
AAACTACACC	TAACCCAAAA	ATACATGATG	TCCACCAGTT	CATAAATACC	ATGGCATGTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
TATTCATGGT	GGCTGGCAGT	AATGTACGAA	ATACATAGCG	GTTGTTGATG	GGTGAGTCAA
ATAAGTACCA	CCGACCGTCA	TTACATGCTT	TATGTATCGC	CAACAACCTAC	CCACTCAGTT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TACTTGGGTG	GTACCCAAAT	CTGCTTCCCC	ATGAAAGAAC	AGAGAATAGT	TTAAATTAGA
ATGAACCCAC	CATGGGTTTA	GACGAAGGGG	TACTTTCTTG	TCTCTTATCA	AATTTAATCT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ATCTTAGCTT	TGGGTGCTAA	TGGTGGAGTT	AAAGACTTTT	TCTCTGATTT	GTCCTTGGAA
TAGAATCGAA	ACCCACGATT	ACCACCTCAA	TTTCTGAAAA	AGAGACTAAA	CAGGAACCTT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AAAGGTTTTT	ATCTCCGGTT	TACAAGACTG	GTGTATTAGC	TGCAGATATC	GCGAAGCTTG
TTTCCAAAAG	TAGAGGCCAA	ATGTTCTGAC	CACATAATCG	ACGTCTATAG	CGCTTCGAAC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TAACATGGTA	AGTGTAAGT	AAAGTGCACT	TGGACGAACC	AGAGTGTAAG	TTAACACAAA
ATTGTACCAT	TCACATGACC	TTTCACGTGA	ACCTGCTTGG	TCTCACATCG	AATTGTGTTT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GCACCCAACT	TACACTTAGG	AGATTTCAAC	TTAACTTGAC	CGCTCTGAGC	TAAACCTAGC
CGTGGGTTGA	ATGTGAATCC	TCTAAAGTTG	AATTGAACTG	GCGAGACTCG	ATTTGGATCG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
CCCAAACCCA	CTCCACCTTA	CTACCAGACA	ACCTTAGCCA	AACCATTTAC	CCAAATAAAG
GGGTTTGGGT	GAGGTGGAAT	GATGGTCTGT	TGGAATCGGT	TTGGTAAATG	GGTTTATTTT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TATAGGCGAT	AGAAATTGAA	ACCTGGCGCA	ATAGATATAG	TACCGCAAGG	GAAAGATGAA
ATATCCGCTA	TCTTTAACTT	TGGACCGCGT	TATCTATATC	ATGGCGTTCC	CTTTCTACTT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
AAATTATAAC	CAAGCATAAT	ATAGCAAGGA	CTAACCCTTA	TACCTTCTGC	ATAATGAATT
TTTAATATTG	GTTCGTATTA	TATCGTTCCT	GATTGGGGAT	ATGGAAGACG	TATTACTTAA

1690	1700	1710	1720	1730	1740
AACTAGAAAT	AACTTTGCAA	GGAGAGCCAA	AGCTAAGACC	CCCGAAACCA	GACGAGCTAC
TTGATCTTTA	TTGAAACGTT	CCTCTCGGTT	TCGATTCTGG	GGGCTTTGGT	CTGCTCGATG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
CTAAGAACAG	CTAAAAGAGC	ACACCCGTCT	ATGTAGCAAA	ATAGTGGGAA	GATTTATAGG
GATTCTTGTC	GATTTTCTCG	TGTGGGCAGA	TACATCGTTT	TATCACCCTT	CTAAATATCC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TAGAGGCGAC	AAACCTACCG	AGCCTGGTGA	TAGCTGGTTG	TCCAAGATAG	AATCTTAGTT
ATCTCCGCTG	TTTGATGGC	TCGGACCACT	ATCGACCAAC	AGGTTCTATC	TTAGAATCAA
1870	1880	1890	1900	1910	1920
CAACTTTAAA	TTTGCCCA	GAACCTCTA	AATCCCCTTG	TAAATTTAAC	TGTTAGTCCA
GTTGAAATTT	AAACGGGTGT	CTTGGGAGAT	TTAGGGGAAC	ATTTAAATTG	ACAATCAGGT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
AAGAGGAACA	GCTCTTTGGA	CACTAGGAAA	AAACCTTGTA	GAGAGAGTAA	AAAATTTAAC
TTCTCCTTGT	CGAGAAACCT	GTGATCCTTT	TTTGGAACAT	CTCTCTCATT	TTTAAATTG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
ACCCATAGTA	GGCCTAAAAG	CAGCCACCAA	TTAAGAAAGC	GTTCAAGCTC	AACACCCACT
TGGGTATCAT	CCGGATTTTC	GTCGGTGGTT	AATCTTTTCG	CAAGTTCGAG	TTGTGGGTGA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
ACCTAAAAAA	TCCCAAACAT	ATAACTGAAC	TCCTCACACC	CAATTGGACC	AATCTATCAC
TGGATTTTTT	AGGGTTTGTA	TATTGACTTG	AGGAGTGTGG	GTAAACCTGG	TTAGATAGTG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CCTATAGAAG	AACTAATGTT	AGTATAAGTA	ACATGAAAAC	ATTCTCCTCC	GCATAAGCCT
GGATATCTTC	TTGATTACAA	TCATATTTCAT	TGTACTTTTG	TAAGAGGAGG	CGTATTCGGA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GCGTCAGATT	AAAACACTGA	ACTGACAATT	AACAGCCCAA	TATCTACAAT	CAACCAACAA
CGCAGTCTAA	TTTTGTGACT	TGACTGTAA	TTGTCGGGTT	ATAGATGTAA	GTTGGTTGTT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GTCATTATTA	CCCTCACTGT	CAACCCAACA	CAGGCATGCT	CATAAGGAAA	GGTTAAAAAA
CAGTAATAAT	GGGAGTGACA	GTTGGGTTGT	GTCCGTACGA	GTATTCCTTT	CCAATTTTTT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
AGTAAAAGGA	ACTCGGCAAA	TCTTACCCCG	CCTGTTTACC	AAAAACATCA	CCTCTAGCAT
TCATTTTCCT	TGAGCCGTTT	AGAATGGGGC	GGACAAATGG	TTTTTGTTAGT	GGAGATCGTA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CACCAGTATT	AGAGGCACCG	CCTGCCCAGT	GACACATGTT	TAACGGCCGC	GGTACCCTAA
GTGGTCATAA	TCTCCGTGGC	GGACGGGTCA	CTGTGTACAA	ATTGCCGGCG	CCATGGGATT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
CCGTGCAAAG	GTAGCATAAT	CACTTGTTCC	TTAAATAGGG	ACCTGTATGA	ATGGCTCCAC
GGCACGTTTC	CATCGTATTA	GTGAACAAGG	AATTTATCCC	TGGACATACT	TACCGAGGTG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GAGGGTTCAG	CTGTCTCTTA	CTTTTAACCA	GTGAAATTGA	CCTGCCCGTG	AAGAGGCGGG
CTCCCAAGTC	GACAGAGAAT	GAAAATTGGT	CACTTTAACT	GGACGGGCAC	TTCTCCGCC

2530	2540	2550	2560	2570	2580
CATAACACAG	CAAGACGAGA	AGACCCTATG	GAGCTTTAAT	TTATTAATGC	AAACAGTACC
GTATTGTGTC	GTTCTGCTCT	TCTGGGATAC	CTCGAAATTA	AATAATTACG	TTTGTCATGG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
TAACAAACCC	ACAGGTCCTA	AACTACCAA	CCTGCATTAA	AAATTTCCGG	TGGGGCGACC
ATTGTTTGGG	TGTCCAGGAT	TTGATGGTTT	GGACGTAATT	TTTAAAGCCA	ACCCCGCTGG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TCGGAGCAGA	ACCCAACCTC	CGAGCAGTAC	ATGCTAAGAC	TTCACCAGTC	AAAGCGAACT
AGCCTCGTCT	TGGGTTGGAG	GCTCGTCATG	TACGATTCTG	AAGTGGTCAG	TTTCGCTTGA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
ACTATACTCA	ATTGATCCAA	TAACCTGACC	AACGGAACAA	GTTACCCTAG	GGATAACAGC
TGATATGAGT	TAAC TAGGTT	ATTGAACTGG	TTGCCTTGTT	CAATGGGATC	CCTATTGTCTG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GCAATCCTAT	TCTAGAGTCC	ATATCAACAA	TAGGGTTTAC	GACCTCGATG	TTGGATCAGG
CGTTAGGATA	AGATCTCAGG	TATAGTTGTT	ATCCCAAATG	CTGGAGCTAC	AACCTAGTCC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACATCCCGAT	GGTGCAGCCG	CTATTAAAGG	TTCGTTTGTT	CAACGATTAA	AGTCCTACGT
TGTAGGGCTA	CCACGTCGGC	GATAATTTCC	AAGCAAACAA	GTTGCTAATT	TCAGGATGCA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GATCTGAGTT	CAGACCGGAG	TAATCCAGGT	CGGTTTCTAT	CTACCTTCAA	ATTCCTCCCT
CTAGACTCAA	GTCTGGCCTC	ATTAGGTCCA	GCCAAAGATA	GATGGAAGTT	TAAGGAGGGA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GTACGAAAGG	ACAAGAGAAA	TAAGGCCCTAC	TTCACAAAGC	GCCTTCCCCC	GTAAATGATA
CATGCTTTCC	TGTTCTCTTT	ATTCCGGATG	AAGTGTTTCG	CGGAAGGGGG	CATTTACTAT
3010	3020	3030	3040	3050	3060
TCATCTCAAC	TTAGTATTAT	ACCCACACCC	ACCCAAGAAC	AGGGTTTGTT	AAGATGGCAG
AGTAGAGTTG	AATCATAATA	TGGGTGTGGG	TGGGTTCCTG	TCCCAAACAA	TTCTACCGTC
3070	3080	3090	3100	3110	3120
AGCCCGGTAA	TCGCATAAAA	CTTAAAACTT	TACAGTCAGA	GGTTCAATTC	CTCTTCTTAA
TCGGGCCATT	AGCGTATTTT	GAATTTTGAA	ATGTCAGTCT	CCAAGTTAAG	GAGAAGAATT
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CAACATACCC	ATGGCCAACC	TCCTACTCCT	CATTGTACCC	ATTCTAATCG	CAATGGCTGA
GTTGTATGGG	TACCGGTTGG	AGGATGAGGA	GTAACATGGG	TAAGATTAGC	GTTACCGACT
3190	3200	3210	3220	3230	
TCATTTGTTA	AGATGGCAGA	GCCCCGTAAT	CGCATAAAAT	GAGACCGGAT	CC
AGTAAACAAT	TCTACCGTCT	CGGGCCATTA	GCGTATTTTA	CTCTGGCCTA	GG

Figur 13



13b

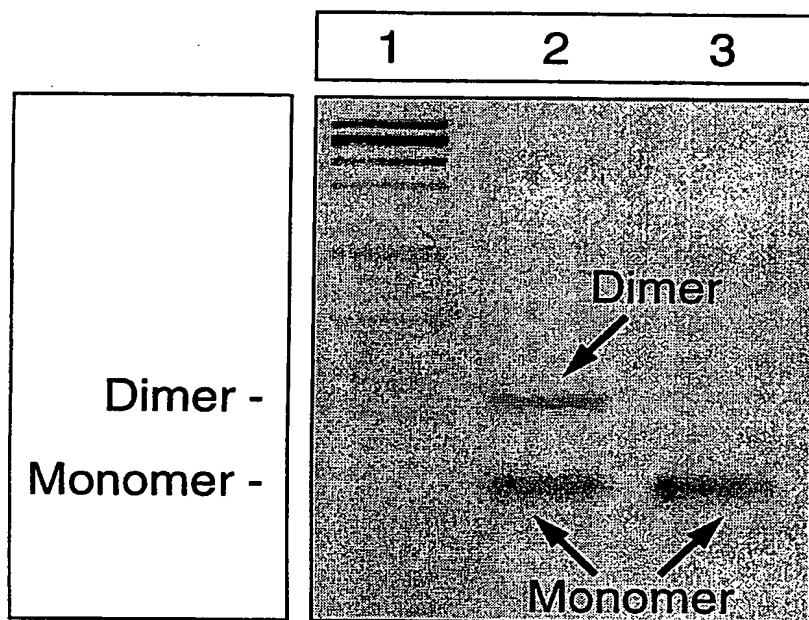
CCCCGGGTACCTTGCAGAGCCC^X
 CCCATGGAACGCTCGGG

HP 1 (X=modifiziertes dT)

TTTTGCAGCTGGATCCCGGGC^A
 CGTCGACCTAGGGCCCG

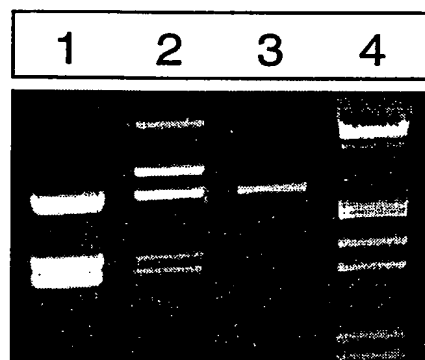
HP 2

Figur 14



Figur 15

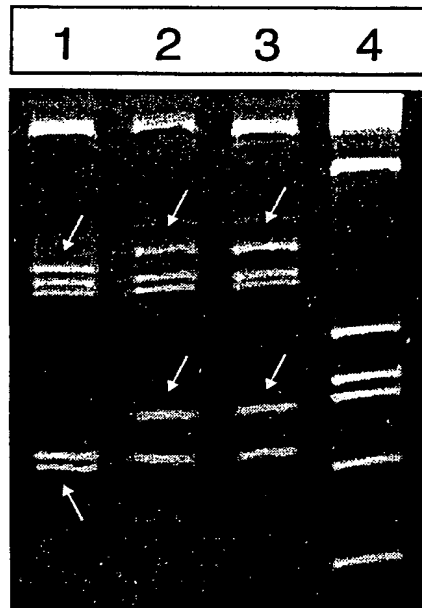
15a



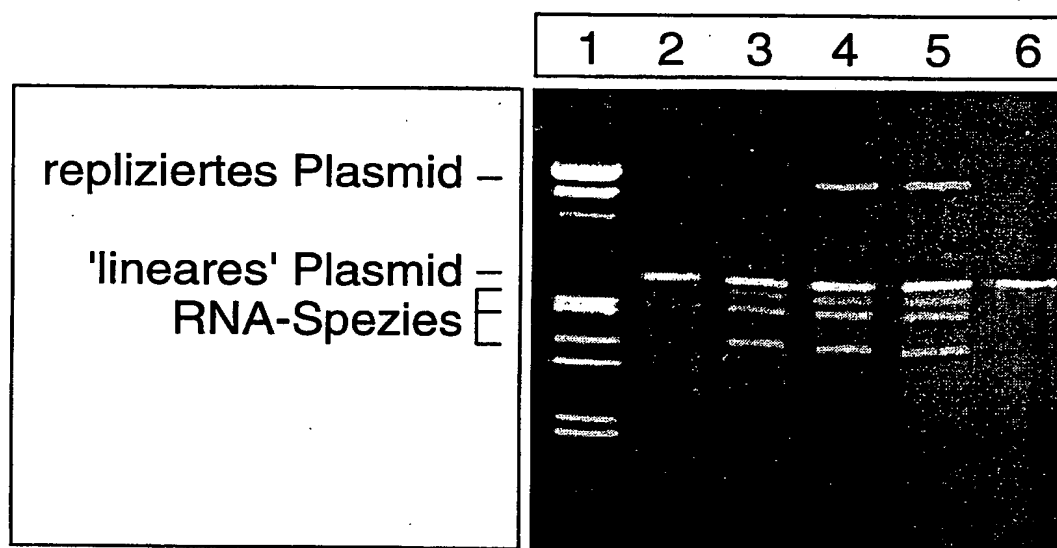
15b

Rechtes Plasmidende □

Linkes Plasmidende [



Figur 16



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.